

Resistenzverhalten
von *Neisseria gonorrhoeae*
in vitro bei wiederholter Exposition
gegenüber Cefotiam und Rifampicin

Karl-Heinz Roth



Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547927_0050

Aus der Dermatologischen Klinik und Poliklinik der Universität München
Direktor: Professor Dr. med. Dr. h. c. Otto Braun-Falco

Resistenzverhalten von **Neisseria gonorrhoeae**
in vitro bei wiederholter Exposition gegenüber
Cefotiam und Rifampicin

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung der Doktorwürde in der gesamten Medizin
an der Ludwig Maximilians-Universität zu München

vorgelegt von
Karl-Heinz Roth
aus
Schrobenhausen

1986

Mit Genehmigung der Medizinischen Fakultät
der Universität München

Berichterstatter: Professor Dr. Dr. Otto Braun-Falco

Mitberichterstatter:

Dekan: Professor Dr. Wolfgang Spann

Tag der mündlichen Prüfung: 3. Juni 1986

Ich danke Herrn Professor Dr. med. Dr. h. c. Braun-Falco für das Thema meiner Dissertation.

Herrn Oberarzt Dr. med. habil. Korting danke ich für die stets kollegiale und freundliche Betreuung meiner Arbeit.

Dank schule ich auch Frau Bergen, Frau Raith und Frau Ebert. Sie gaben mir als medizinisch-technische Assistentinnen manchen Hinweis und wußten bei auftretenden Schwierigkeiten Rat.

Ich danke Herrn Dr. med. Neubert, dem Leiter des bakteriologischen Labors, für seine Unterstützung.

Mein Dank gilt auch der Fa. Grünenthal, Stolberg, der Firma Upjohn, Heppenheim, der Firma Boehringer Mannheim, der Firma Cynamid, Wolfstatshausen und der Firma ICI-Pharma, Heidelberg. Sie überließen mir freundlich die Antibiotika.

Frau Messerer vom Institut für Medizinische Informationsverarbeitung, Statistik und Biomathematik danke ich für ihre Beratung.

Inhaltsverzeichnis

Seite

1	Einleitung :	1
	Resistenzentwicklung bei Neisseria gonorrhoeae	
2	Fragestellung	2
3	Material und Methoden	3
3.1	Material	3
3.2	Methoden	3
3.2.1	Darstellung des Versuchsaufbaus	3
3.2.2	Mikrobiologisches Vorgehen	5
3.2.3	Statistische Auswertung	8
4	Ergebnisse	10
4.1	Ergebnisse aus den Experimenten mit Rifampicin und Cefotiam	10
4.1.1	Ergebnisse aus den Experimenten mit Rifampicin	10
4.1.2	Ergebnisse aus den Experimenten mit Cefotiam	15
4.1.3	Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den Experimenten mit Rifampicin und Cefotiam	20
4.2	Veränderungen in der Empfindlichkeit gegenüber weiteren Antibiotika	22
4.2.1	Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Rifampicin-Gruppe	22
4.2.2	Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Cefotiam-Gruppe	27
4.2.3	Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Vergleichsgruppe	31
4.2.4	Vergleich der drei Gruppen bei den Veränderungen in der Empfindlichkeit gegenüber weiteren Antibiotika	31
5	Diskussion	38
5.1	Diskussion der Methode	39
5.1.1	Zusammensetzung des Nährmediums	39
5.1.2	Größe des Inokulums	40
5.1.3	Bebrütungszeit	40
5.1.4	Einfluß der Wachstumsstufe, von der weiterkultiviert wird	41
5.1.5	Empfindlichkeitsbestimmung	41

5.1.6	Vergleichsgruppe (Passagen auf hemmstofffreiem Nährmedium)	42
5.2	Diskussion der Ergebnisse	42
5.2.1	Diskussion der Resistenzsteigerungsversuche	42
5.2.1.1	Resistenzsteigerungsversuche mit Rifampicin	42
5.2.1.2	Resistenzsteigerungsversuche mit Cefotiam	43
5.2.2	Diskussion von Veränderungen in der Empfindlichkeit gegenüber weiteren Antibiotika	44
5.2.2.1	Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Rifampicin-Gruppe	44
5.2.2.2	Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Cefotiam-Gruppe	46
5.2.2.3	Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Vergleichsgruppe	46
5.3	Klinische Bedeutung der Resistenzsteigerungsversuche	48

1. EINLEITUNG :

Resistenzentwicklung bei *Neisseria gonorrhoeae*

Verursachen resistente Keime eine Infektion oder werden die Keime während einer Therapie resistent, so versagt die Behandlung (absolute Resistenz). Eine Antibiotikatherapie schlägt auch fehl, wenn die verabreichte Dosis im Verhältnis zur Empfindlichkeit des Erregers zu gering war (relative Resistenz, Naumann 1966). Gerade unter subinhibitorischen Wirkstoffspiegeln können leicht resistente Erreger selektiert werden. Solche Keime tragen zur Verbreitung der Resistenz gegenüber einem Wirkstoff und verwandten Substanzen bei (Drews 1979). Diese Vorgänge lassen sich in vitro simulieren (Naumann 1966).

In der Vergangenheit entwickelte der Erreger der Gonorrhoe, ***Neisseria gonorrhoeae***, bei breiter klinischer Anwendung bis dahin wirksamer Antibiotika Resistenz: in Deutschland schlug die zunächst meist erfolgreiche Therapie mit Sulfonamiden nach wenigen Jahren zunehmend fehl, berichtete Felke 1938 und 1948. Penicillin blieb nach seiner Einführung über viele Jahre voll wirksam. Gegen Ende der fünfziger Jahre beobachtete Röckl (1959) zunehmende Resistenz.

Diese Entwicklung hält an (Storck und Schwarz-Speck 1969). Resistenzsteigerungen ergaben sich auch bei Antibiotika anderer Stoffklassen, z. B. beim Tetracyclin, vor allem aber beim Aminoglykosid Streptomycin (Reyn 1969, Willcox 1970, Sparling 1972). Zum Teil sind Gonokokkenstämme gegenüber mehreren Antibiotika gleichzeitig resistent. Bis 1976 beobachtete man bei Gonokokken nur chromosomal bedingte Resistenzen. Seither werden immer wieder Stämme isoliert, die Plasmide enthalten. Solche Gonokokken sind gegenüber manchen Antibiotika, insbesondere Penicillin, hoch resistent (Phillips 1976, Ashford et al. 1976, Culliton 1976, Murray und Moellering 1978).

2. FRAGESTELLUNG

Heute verfügen wir über völlig neu entwickelte Antibiotika, nämlich Cephalosporine, die Penicillin möglicherweise ersetzen können (Korting 1984). Ein wichtiger Vertreter dieser neuen Cephalosporine ist Cefotiam (Lode 1982).

Vor einer breiten klinischen Anwendung eines derartigen Antibiotikums ist zu fragen: verliert diese Substanz an Wirkung, und in welchem Zeitraum muß damit gerechnet werden? Dies soll anhand einiger Experimente in vitro geklärt werden. Dabei gilt das Interesse hier der chromosomal bedingten Resistenz und nicht der übertragbaren, an Plasmide gebundene Resistenz. Zur Untersuchung werden daher plasmidfreie **Neisseria gonorrhoeae**-Stämme herangezogen, d. h. Stämme, die keine Betalactamase bilden.

3. MATERIAL UND METHODEN

3.1 Material

In den vorliegenden Experimenten untersuche ich das Resistenzverhalten an fünf verschiedenen frischen Isolaten von **Neisseria gonorrhoeae**. Sie wurden 1981 bzw. 1982 aus der Harnröhre von fünf Männern gewonnen, die an einer unkomplizierten Gonorrhoe litten. Die Keime lagerten bei -80°C in fetalem Kälberserum mit 10 % Saccharose. Für die Experimente erfolgte die Auswahl nach der Penicillinempfindlichkeit.

3.2 Methoden

3.2.1 Darstellung des Versuchsaufbaus

Mit der vorliegenden Untersuchung soll festgestellt werden, inwieweit wiederholte Exposition gegenüber subinhibitorischen Antibiotikumkanzentrationen zu einer Steigerung der Resistenz bei den fünf eingesetzten **Neisseria gonorrhoeae**-Stämmen führt.

Als Vertreter der Cephalosporine wurde Cefotiam gewählt. Es wirkt gut bei der Gonorrhoe, wie aus klinischen Untersuchungen bekannt ist (Korting 1984). Unter Rifampicin entwickeln die Gonokokken schnell Resistenz (Simon u. Stille 1982). Rifampicin soll aus diesem Grunde dazu dienen, die Methode einer Resistenzsteigerung in vitro zu überprüfen.

Zunächst wird die Empfindlichkeit der fünf **Neisseria gonorrhoeae**-Stämme gegenüber Cefotiam, Rifampicin und sechs weiteren Antibiotika bestimmt: Penicillin G, Ceftizoxim, Cefotetan, Tetracyclin, Streptomycin und Spectinomycin. Alle Substanzen hemmen das Wachstum von Gonokokken (Willcox 1970, Gordts et al. 1982, Phillips et al. 1983).

Dann werden drei Gruppen gebildet, die jeweils aus den fünf Stämmen bestehen. Gruppe 1: Selektion durch Rifampicin; Gruppe 2: Selektion durch Cefotiam; Gruppe 3: keine Selektion durch Antibiotika (Vergleichsgruppe). Jede Gruppe durchläuft 25 Passagen unter subinhibitorischen Antibiotikumkanzentrationen. Dabei wird die minimale Hemmkonzentration der Kulturen gemessen, gleichzeitig werden unempfindliche Keime selektiert. Die unempfindlichsten Keime eines jeden Stammes werden auf zwischengeschaltete Subkulturplatten mit hemmstofffreiem Nährmedium übertragen. Diese dienen

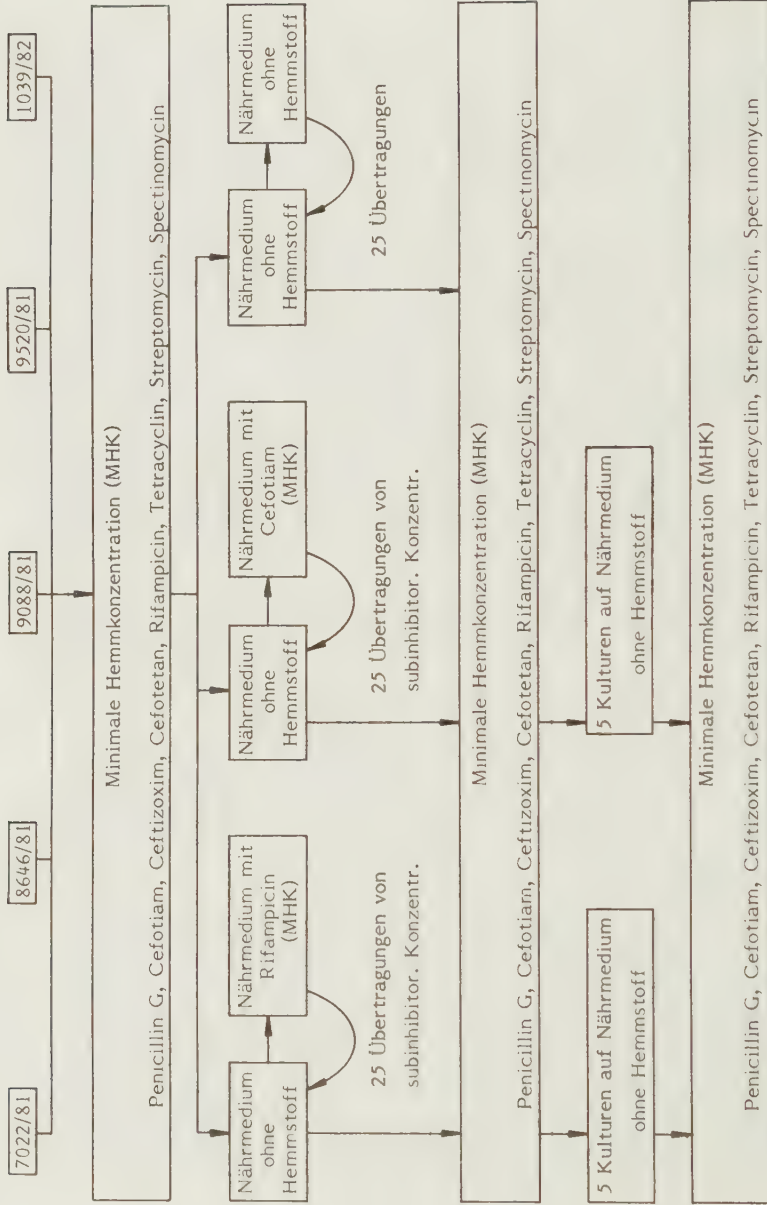


Abb. 1 Flußdiagramm zum Versuchsaufbau. Erläuterungen im Text.
(subinhibitor. Konzentr. = höchste subinhibitorische Konzentration eines Antibiotikums)

dazu, das Material zu vermehren.

Anschließend, nach einer weiteren Passage, wird in den drei Gruppen die Empfindlichkeit gegenüber den acht Antibiotika ermittelt. Die nunmehr vorliegende Antibiotikaresistenz in der Rifampicin- und Cefotiam-Gruppe wird in fünf aufeinanderfolgenden Subkulturen auf ihre Stabilität geprüft. Abschließend wird erneut die Empfindlichkeit gegenüber allen acht Antibiotika in den beiden Gruppen bestimmt. Den Versuchsaufbau veranschaulicht Abbildung 1.

3.2.2 Mikrobiologisches Vorgehen

Die fünf **Neisseria gonorrhoeae**-Stämme werden zunächst verifiziert: Unter dem Mikroskop erscheinen sie als gramnegative Diplokokken. Auf festen Nährböden bilden sie flache, runde, durchscheinende Kolonien. Teststreifen zum Nachweis der Cytochromoxidase (PATHO TEC, Gödecke, Berlin) färben sich typischerweise blau. Die Kokken spalten Glucose, nicht aber Maltose und Saccharose (Hallmann und Burkhardt 1974). Die Kohlenhydratspaltung wird mit GLUCIDISCS (bioMérieux, Nürtingen) auf Columbia-Agar-Basis (Biologische Arbeitsgemeinschaft, Lich) mit 2 % Bacto-PPLO-Serum (Nr. 0441, Difco, Detroit, USA) und 2 % Phenolrot als Indikator getestet: gelbe Färbung des Nährbodens zeigt die Glucosespaltung an. Die Stämme bilden keine Beta-Lactamase: Suspension in einer Lösung chromogenen Cephalosporins führt zu keinem Farbumschlag (O'Callaghan et al. 1972).

Die Verifizierung wird mehrmals im Verlauf der Experimente wiederholt, um Verunreinigungen auszuschließen.

Die Empfindlichkeit der **Neisseria gonorrhoeae**-Stämme wird für folgende Antibiotika bestimmt (die Bezeichnung der Charge steht in Klammern):

Penicillin-G-Na (2G1706), Cefotiam-di-hydro-chlorid (2D1006), Ceftizoxim (813764A), Streptomycin-Sulfat (62) und Rifampicin (2F9421) von Grünenthal GmbH, Stolberg; Cefotetan (51088/82) von ICI-Pharma, Heidelberg; Tetracyclin (A530062) von Cynamid GmbH, Wolfratshausen, Spectinomycin-di-hydro-chlorid (81A05B999M) von Upjohn GmbH, Heppenheim/Bergstraße.

Als Maß für die Empfindlichkeit der Erreger dient die minimale Hemmkonzentration. Dies ist die Antibiotikumkonzentration in mg/l Nährboden, die eine vollständige Wachstumshemmung bewirkt. Bei Gonokokken wird zur Be-

stimmung üblicherweise der Agar-Dilutions-Test verwendet (Ericsson und Sherris 1971). Die unterschiedlichen Antibiotikumkonzentrationen erhält man durch Verdünnen in einer geometrischen Reihe: Dazu wird eine bestimmte Menge der Substanz in Aqua destillata gelöst und in Stufen von 1 : 2 verdünnt. Rifampicin muß in Methanol gelöst werden und kann dann wie die anderen Antibiotika verdünnt werden.

In den Experimenten kultiviere ich nur die relativ unempfindlichsten Gonokokken weiter, d. h., sie werden von einer Verdünnungsstufe übertragen, die eine unterhalb der minimalen Hemmkonzentration liegt. Beträgt die minimale Hemmkonzentration z. B. 0,016 mg/l, so werden die Gonokokken von der Verdünnungsstufe 0,008 mg/l ausgehend weiter gezüchtet. Dieser "Grenzwachstumsstufe" (Marcuse u. Hussels 1954) entspricht die höchste subinhibitorische Antibiotikumkonzentration. Die nächst niedrigere "grenznächste Wachstumsstufe" entspricht der zweithöchsten subinhibitorischen Antibiotikumkonzentration. Sie liegt im oben angegebenen Beispiel bei 0,004 mg/l.

Gonokokken sind anspruchsvolle Bakterien. Zum Wachsen benötigen sie menschliches oder tierisches Eiweiß im Nährmedium, eine Temperatur von 37°C und eine kohlendioxidangereicherte Atmosphäre (Hallmann u. Burkhardt 1974). Das Nährmedium besteht aus einer Lösung mit 45 g/l Bacto-Proteose Nr. 3 (Difco), einer zweiten Lösung mit 10 g/l getrocknetem Rinderhämoglobin (BBL, Cockeysville, USA) und mit ein bis zwei Tropfen Silicon-Antischaumemulsion M-30 pro Liter). Beide Lösungen werden getrennt 15 Minuten lang bei 120°C autoklaviert und nach dem Abkühlen auf etwa 55°C gemischt. 20 ml Iso-VitaleX-Enrichment (BBL) pro Liter vervollständigen das Nährmedium. Es kann nun in sterile Petrischalen mit neun cm Durchmesser gegossen werden. Dabei wird jeweils ein Antibiotikum in verschiedenen Mengen zugegeben; es entsteht eine geometrische Verdünnungsreihe. Die so zubereiteten Kulturplatten können acht Tage bei 4°C im Kühlschrank aufbewahrt werden, ohne daß sich die minimale Hemmkonzentration bei Gonokokken ändert.

Die Empfindlichkeitsmessung beim Agar-Dilutions-Test ist vom Inokulum abhängig, d. h., von der Zahl der inkubierten koloniebildenden Keime. Ein geeignetes und ausreichend genaues Verfahren besteht darin, die Trübung einer Suspension mit Gonokokken photometrisch zu messen.

Das Suspensionsmedium enthält 30 g/l Trypticase Soy Broth (BBL) und

10 ml/l Iso-VitaleX-Enrichment. Autoklaviert kann es im Kühlschrank bei 4°C aufbewahrt werden.

Im Suspensionsmedium vermehren sich die Gonokokken nicht (Sparling 1966). Mit einem Photometer Spectronic 20 von Bausch und Lomb (München) wird bei 500 nm eine Extinktionsdifferenz von 0,25 in der Suspension eingestellt: Dazu wird ein steriles Glasröhrchen mit dem Medium im Wasserbad auf 37°C erwärmt, der Nullpunkt am Photometer eingestellt und Gonokokken mit der Platinöse eingerieben. Bis zur Verimpfung bleibt das Röhrchen im Wasserbad (nach Neubert et. al. 1982, Justierung entsprechend eigenen Eichkurven nach systematischem Verdünnen und Ausplätieren). Die Verimpfung der Suspensionen auf die Kochblutplatten erfolgt mit einem Vielpunkt-Inokulator von Denley Technics Ltd. (MAST, Hamburg). Jeder Impfpunkt enthält etwa 5×10^4 koloniebildende Keime. Die beimpften Nährböden werden bei 37°C und 4,5 Vol% Kohlendioxid 21 bis 23 Stunden bebrütet. Von den beimpften Platten werden die Gonokokken der Grenzwachstumsstufe mit der Platinöse auf die hemmstofffreien Nährmedien übertragen. Dazu wird das gesamte Material eines Impfpunktes abgeschabt. Für die Suspension werden Keime mehrerer Kolonien eingerieben. Dieses Vorgehen soll zusätzliche Selektion ausschließen. Bei der Auswertung des Agar-Dilutions-Testes sind Schwankungen um eine Titerstufe im Ergebnis unvermeidlich, denn mehrere Betrachter beurteilen das Koloniewachstum auf den Agarplatten unterschiedlich. Diese Schwankung entspricht dem Ablesefehler.

Gelegentlich bilden die Keime der Grenzwachstumsstufe zwar Kolonien, lassen sich aber nicht mehr weiter subkultivieren. In diesen Fällen wird auf die grenznächste Wachstumsstufe des gleichen Stammes aus dem vorangegangenen Versuchsschritt zurückgegriffen und das Experiment fortgesetzt.

Von jedem Versuchsschritt werden Kokken aller Stämme tiefgefroren. Bei Verunreinigung oder bei Nichtangehen in der nächsten Passage ist es so möglich, den Durchgang zu wiederholen. Die zusätzlich notwendige Subkultur muß dabei in Kauf genommen werden. Eine Beeinflussung des Ergebnisses ist kaum zu erwarten. Die Weltgesundheitsorganisation stellte den **Neisseria gonorrhoeae**-Referenzstamm Nr. III für die Bestimmung der minimalen Hemmkonzentration zur Verfügung. Die Gonokokken einer Subkultur werden portionsweise tiefgefroren. Für jeden Versuchsschritt wird eine Portion auf-

getaut, kultiviert und in die Auswertung mit einbezogen. So läßt sich der Meßfehler errechnen.

Mit Gonokokken der Vergleichsgruppe wird verfahren wie mit denen in der Rifampicin- und Cefotiam-Gruppe. Das Nährmedium für die Kultur enthält kein Antibiotikum.

Tiefgefrieren läßt die Empfindlichkeit der Gonokokken unbeeinflußt (Sparling 1966). Im laborüblichen Medium aus fetalem Kälberserum mit 10 % Saccharose überleben die Keime bei -80°C jahrelang ohne Schaden.

Alle Suspensionen eines Versuchsschrittes werden zusätzlich auf Kochblutplatten geimpft, die kein Antibiotikum enthalten. So läßt sich das Angehen der Keime prüfen.

Am Ende des Versuchs sollen fünf aufeinanderfolgende Subkulturen zeigen, ob ein erreichtes Resistenzniveau stabil ist. Beständige Hemmkonzentrationen weisen hin auf eine vererbte Eigenschaft der Keime, die chromosomal verankert ist (Sparling 1966, Drews 1979).

3.2.3 Statistische Auswertung

Zunächst wird für jedes Antibiotikum getrennt die Empfindlichkeit der fünf **Neisseria gonorrhoeae**-Stämme zu Beginn und am Ende der Experimente miteinander verglichen. Die Hypothesen lauten:

Die fünf Stämme verändern ihre Empfindlichkeit gegenüber Rifampicin im Verlauf der Experimente nicht.

Die fünf Stämme verändern ihre Empfindlichkeit gegenüber Rifampicin im Verlauf der Experimente.

Die fünf Stämme verändern ihre Empfindlichkeit gegenüber Cefotiam im Verlauf der Experimente nicht.

Die fünf Stämme verändern ihre Empfindlichkeit gegenüber Cefotiam im Verlauf der Experimente.

Die Hypothesen sind zweiseitig formuliert. Mutationen sind grundsätzlich ungerichtet, so daß das Resistenzniveau nach dem Versuch höher oder niedriger sein kann als vorher.

Die Auswertung erfolgte mit einem verteilungsfreien Test von Wilcoxon für gepaarte Meßwerte (Immich 1974). Die Differenz aus der minimalen Hemmkonzentration vor den abschließenden fünf Passagen ohne Antibiotikum und

derjenigen zu Beginn der Experimente wird für jeden Stamm gebildet. Den nach der Größe geordneten Ergebnissen werden wieder Ränge zugeteilt. Die Summe der Ränge mit negativem Vorzeichen ergibt die Prüfgröße. Das Signifikanzniveau beträgt 0,10. Da nur fünf Meßwertpaare in die Bewertung eingehen, erscheint eine niedrigere Sicherheitswahrscheinlichkeit sinnlos. Signifikanzniveaus unter 0,10 sind auch nicht tabelliert (Documenta Geigy 1977).

Ein zweiter Test prüft die Veränderung der Empfindlichkeit bei Rifampicin im Vergleich mit der bei Cefotiam jeweils für die fünf **Neisseria gonorrhoeae**-Stämme.

Die Hypothesen lauten:

Rifampicin und Cefotiam führen im Verlauf der Experimente zu gleichhohen Veränderungen der Empfindlichkeit bei den fünf Stämmen. Rifampicin und Cefotiam führen im Verlauf der Experimente nicht zu gleich hohen Veränderungen der Empfindlichkeit bei den fünf Stämmen.

Die Hypothesen sind wieder zweiseitig formuliert.

Zugrunde gelegt wird ein verteilungsfreies Prüfverfahren von Wilcoxon für unabhängige Stichproben (Immich 1974). Der Test vergleicht Mittelwerte und damit die Lage von Verteilungen. Es werden die oben beschriebenen Differenzen gebildet, für beide Gruppen gemeinsam der Größe nach geordnet und entsprechende Ränge zugeteilt.

Die Summe der Ränge in einer Gruppe bildet die Prüfgröße. Die kritischen Werte sind für verschiedene Signifikanzniveaus tabelliert (Documenta Geigy 1977).

Es erscheint nicht sinnvoll, die Veränderung der Empfindlichkeiten für alle acht Antibiotika statistisch zu prüfen. Die Meßwerte sind voneinander abhängig, so daß zufällig falsche Ergebnisse zustande kommen können.

4. E R G E B N I S S E

4.1 Ergebnisse aus den Experimenten mit Rifampicin und Cefotiam

4.1.1 Ergebnisse aus den Experimenten mit Rifampicin

Unter subinhibitorischen Konzentrationen von Rifampicin stieg bei allen fünf Gonokokkenstämmen die minimale Hemmkonzentration an (Abb. 2, Tab. 1). Zu Beginn der Experimente reichten 0,032 mg/l bis 0,5 mg/l Rifampicin aus, die Vermehrung zu verhindern. Am Ende waren 4,0 mg/l notwendig. Für die fünf Stämme betrug das geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentrationen zu Beginn 0,144 mg/l und am Ende 4,0 mg/l Rifampicin. Dies entspricht etwa dem Siebenundzwanzigfachen der Ausgangskonzentration. Die Standardabweichung der Meßergebnisse betrug $6,7 \times 10^{-3}$ mg/l, berechnet aus den minimalen Hemmkonzentrationen des Referenzstammes der Weltgesundheitsorganisation (Tab. 2). Kleine Schwankungen der minimalen Hemmkonzentration sind erklärbar durch den Ablesefehler, der eine Verdünnungsstufe umfaßt.

Die Stämme erhöhten ihre Widerstandsfähigkeit im Verlauf der Experimente unterschiedlich (Abb. 2). Bei den Stämmen 7022/81 und 8646/81 waren Sprünge über mehrere Verdünnungsstufen zu beobachten. Die drei anderen Stämme gewannen stetig an Widerstandskraft.

Bei dem anfangs empfindlichen Stamm 7022/81 stieg die minimale Hemmkonzentration deutlicher als bei den anderen, nämlich von 0,032 mg/l auf 4,0 mg/l. Bei dem initial am wenigsten empfindlichen Stamm 1039/82 genügten statt 0,5 mg/l zu Beginn, am Ende 4,0 mg Rifampicin pro Liter zur Hemmung.

In der Vergleichsgruppe (ohne Antibiotikum) nahm die Empfindlichkeit im Verlauf der Experimente ebenfalls ab. Schließlich betrug die minimale Hemmkonzentration maximal 1,0 mg/Rifampicin pro Liter (Tab. 3).

Für die fünf Stämme betrug das geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentrationen zu Beginn 0,144 mg/l und am Ende der Experimente 0,330 mg/l Rifampicin.

Stamm 7022/81 erhöhte seine Widerstandsfähigkeit stärker als die übrigen: von 0,032 mg/l auf 0,250 mg/l. Diese Rifampicinkonzentration verhinderte auch das Wachstum der Stämme 8646/81 und 9520/81. Stamm 1039/82

Minimale Hemmkonzentration
(mg Rifampicin pro l)

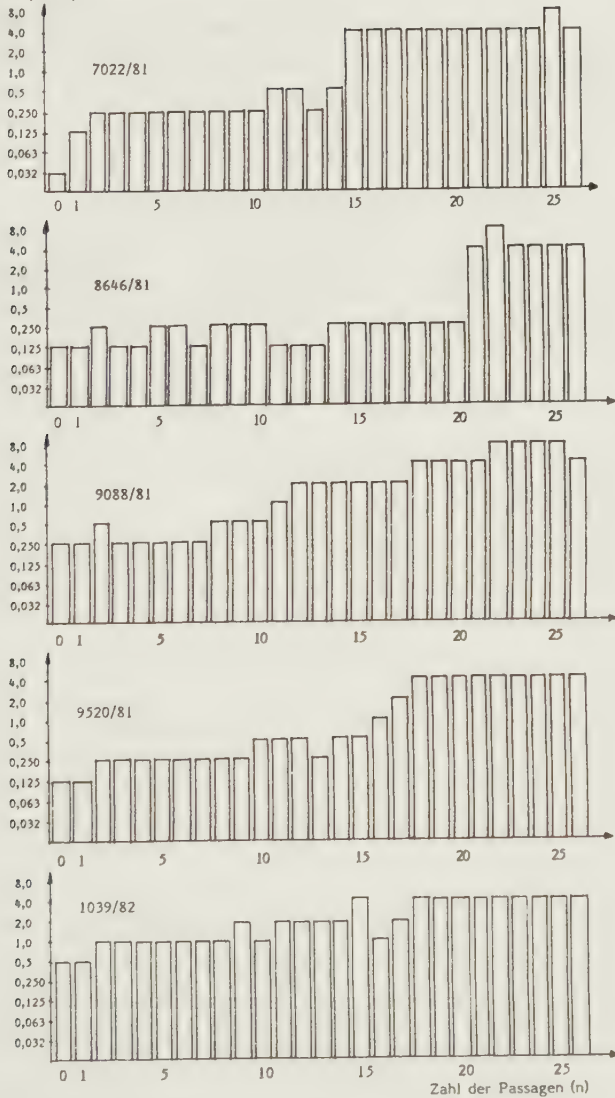


Abb. 2 Empfindlichkeitsveränderungen von fünf *Neisseria gonorrhoeae*-Stämmen unter subinhibitorischen Konzentrationen von Rifampicin im Agar-Dilutions-Verfahren

Tab. 1

Minimale Hemmkonzentrationen von 5 *Neisseria gonorrhoeae*-Stämmen unter subinhibitorischen Konzentrationen von Rifampicin im Agar-Dilutions-Verfahren

Stamm	Minimale Hemmkonzentration (mg/ l)		
	zu Beginn	nach dem Resistenzsteigerungsversuch	nach 5 Kulturen auf hemmstofffreiem Nährboden
7022/81	0,032	4,0	4,0
8646/81	0,125	4,0	4,0
9088/81	0,250	4,0	4,0
9520/81	0,125	4,0	4,0
1039/82	0,500	4,0	4,0
geometrisches Mittel	0,144	4,0	4,0

T = 0; p < 0,10;

Tab. 2

Berechnung des Meßfehlers für die Agarplatten mit Rifampicin:

Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) des **Neisseria gonorrhoeae**-Referenzstammes III der Weltgesundheitsorganisation und ihre absoluten Häufigkeiten

MHK (mg/ l)	0,008	0,016	0,032	Summe
absolute Häufigkeiten	1	21	5	27

Mittelwert: 0,0186 mg/ l

Standardabweichung: 0,0067 mg/ l

(nach Documenta Geigy 1977)

Tab. 3

Minimale Hemmkonzentrationen von 5 Stämmen **Neisseria gonorrhoeae** nach Kultur auf hemmstofffreien Nährböden gegenüber Rifampicin

Stamm	Minimale Hemmkonzentration (mg/ l)	
	zu Beginn	nach Versuchsende
7022/81	0,032	0,250
8646/81	0,125	0,250
9088/81	0,250	0,250
9520/81	0,125	0,250
1039/82	0,500	1,0
geometri- sches Mittel	0,144	0,330

benötigte 1,0 mg/l zur Hemmung.

In der Vergleichsgruppe lagen die absoluten und die mittleren minimalen Hemmkonzentrationen nach den Experimenten stets deutlich niedriger als in der Rifampicin-Gruppe.

Stamm 9520/81 der Vergleichsgruppe war in der 24. Passage verunreinigt und konnte nicht mehr rein isoliert werden. Er durchlief insgesamt 23 Übertragungen. Bei den anderen fiel über 25 Passagen keine Verunreinigung auf.

Die fünf *Neisseria gonorrhoeae*-Stämme werden unter subinhibitorischen Konzentrationen von Rifampicin zunehmend resistent, wie die statistische Prüfung ergibt ($T=0$; $p < 0,10$). Das Ergebnis ändert sich nicht, wenn die Vergleichsgruppe berücksichtigt wird.

In der Rifampicin-Gruppe verändert sich die minimale Hemmkonzentration über fünf Passagen auf hemmstofffreiem Nährmedium nicht (Tab. 1).

4.1.2 Ergebnisse aus den Experimenten mit Cefotiam

Unter subinhibitorischen Konzentrationen von Cefotiam stieg die minimale Hemmkonzentration an bei vier von fünf Gonokokkenstämmen. Beim fünften Stamm blieb die Hemmkonzentration auf Ausgangsniveau (Abb. 3, Tab. 4). Zu Beginn der Experimente konnte die Vermehrung mit 0,008 mg/l bis 0,125 mg/l verhindert werden; am Ende reichten 0,032 mg/l bis 0,125 mg/l Cefotiam aus. Das geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentrationen betrug zu Beginn 0,018 mg/l und nach den Experimenten 0,055 mg/l für die fünf Gonokokkenstämmen. Dies entspricht etwa dem Dreifachen der Ausgangskonzentration. Die Standardabweichung der Meßergebnisse, errechnet aus den minimalen Hemmkonzentrationen des Referenzstammes der Weltgesundheitsorganisation gegenüber Cefotiam, war $22,6 \times 10^{-3}$ mg/l (Tab. 5). Der Ablesefehler umfaßt wieder eine Verdünnungsstufe. Bei allen Stämmen nahm die minimale Hemmkonzentration im Verlauf der Experimente wechselnd zu und wieder ab. Die Schwankung umfaßte in der Regel eine Verdünnungsstufe.

Zweimal mußte auf Kokken der grenznächsten Wachstumsstufe zurückgegriffen werden: bei Stamm 7022/81 wurden zur dritten und siebzehnten Passage entsprechende Keime des vorausgegangenen Versuchs-

Minimale Hemmkonzentration
(mg Cefotiam pro l)

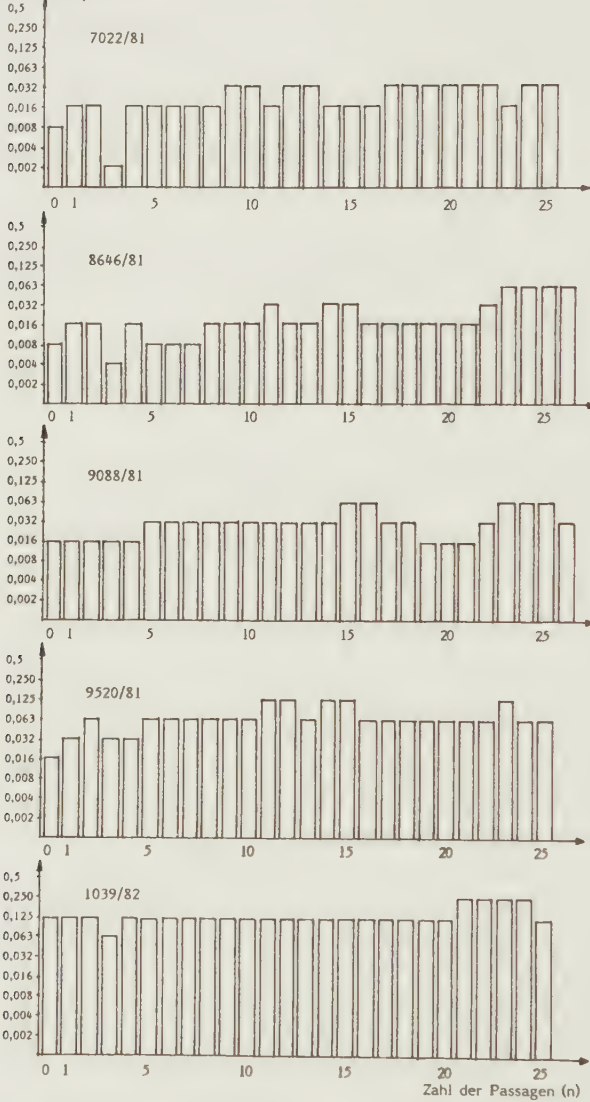


Abb. 3 Empfindlichkeitsveränderungen von fünf *Neisseria gonorrhoeae*-Stämmen unter subinhibitorischen Konzentrationen von Cefotiam im Agar-Dilutions-Verfahren

Tab. 4

Minimale Hemmkonzentrationen von 5 *Neisseria gonorrhoeae*-Stämmen unter subinhibitorischen Konzentrationen von Cefotiam im Agar-Dilutions-Verfahren

Stamm	Minimale Hemmkonzentration (mg/l)		
	zu Beginn	nach dem Resistenzsteigerungsversuch	nach 5 Kulturen auf hemmstofffreiem Nährboden
7022/81	0,008	0,032	0,032
8646/81	0,008	0,063	0,032
9088/81	0,016	0,032	0,032
9520/81	0,016	0,063	0,063
1039/82	0,125	0,125	0,063
geometrisches Mittel	0,018	0,055	0,042

(statistische Auswertung nicht möglich)

Tab. 5

Berechnung des Meßfehlers für die Agarplatten mit Cefotiam:

Minimale Hemmkonzentrationen (MHK) des **Neisseria gonorrhoeae**-Referenzstammes III der Weltgesundheitsorganisation und ihre absoluten Häufigkeiten

MHK (mg/l)	0,004	0,008	0,016	0,032	Summe
absolute Häufigkeiten	1	2	10	12	25

Mittelwert: 0,0226 mg/ l

Standardabweichung: 0,0097 mg/ l

(nach Documenta Geigy 1977)

Tab. 6

Minimale Hemmkonzentrationen von 5 **Neisseria gonorrhoeae**-Stämmen nach Kultur auf hemmstofffreien Nährböden gegenüber Cefotiam

Stamm	Minimale Hemmkonzentration (mg/l)	
	zu Beginn	nach Versuchsende
7022/81	0,008	0,063
8646/81	0,008	0,063
9088/81	0,016	0,016
9520/81	0,016	0,063
1039/82	0,125	0,125
geometri- sches Mittel	0,018	0,055

schritts verimpft. Insgesamt erreichte er 24 Passagen. Die Stämme 8646/81 durchliefen 26 Übertragungen, die Stämme 9520/81 und 1039/82 nur 25; sie waren in der 25. Passage verunreinigt. Die Kokken des 24. Versuchsschritts ließen sich weiterkultivieren. Auf den mitgeführten, hemmstofffreien Kontrollplatten gingen die Gonokokken immer an.

Über 26 Passagen war der Sensitivitätsunterschied bei Stamm 8646/81 am größten: anfangs betrug die minimale Hemmkonzentration 0,008 mg/l, am Ende 0,063 mg/l Cefotiam. Bei Stamm 1039/82 genügte nach 25 Passagen die Ausgangskonzentration von 0,125 mg/l, um seine Vermehrung zu unterbinden.

In der Vergleichsgruppe lag die minimale Hemmkonzentration nach 25 Passagen auf hemmstofffreien Nährböden bei den Stämmen 7022/81 und 9088/81 um eine Verdünnungsstufe höher als in der Cefotiamgruppe. Bei den anderen Stämmen blieb sie auf gleicher Höhe (Tab. 6).

Die Ergebnisse können mit dem beschriebenen statistischen Prüfverfahren nicht ausgewertet werden. Mehrere Differenzen ergeben Null, so daß keine Ränge vergeben werden können.

In der Cefotiamgruppe sanken die minimalen Hemmkonzentrationen über fünf Kulturen auf hemmstofffreiem Nährboden bei den Stämmen 8646/81 und 1039/82 um eine Verdünnungsstufe. Bei den drei anderen blieben sie konstant (Tab. 4).

4.1.3 Gegenüberstellung der Ergebnisse aus den Experimenten mit Rifampicin und Cefotiam

Nach den Experimenten liegen die geometrischen Mittel der minimalen Hemmkonzentrationen in der Rifampicin-Gruppe bei 4,0 mg/l und in der Cefotiam-Gruppe bei 0,055 mg/l (Tab. 1 u. 4).

Die Widerstandskraft der Gonokokken nimmt gegenüber Rifampicin stärker zu als gegenüber Cefotiam. Im Mittel beträgt die minimale Hemmkonzentration nach den Experimenten in der Rifampicin-Gruppe das Siebenundzwanzigfache, in der Cefotiam-Gruppe das Dreifache der Ausgangskonzen-

Geometrische Mittel der
minimalen Hemmkonzentrationen
(mg/l)

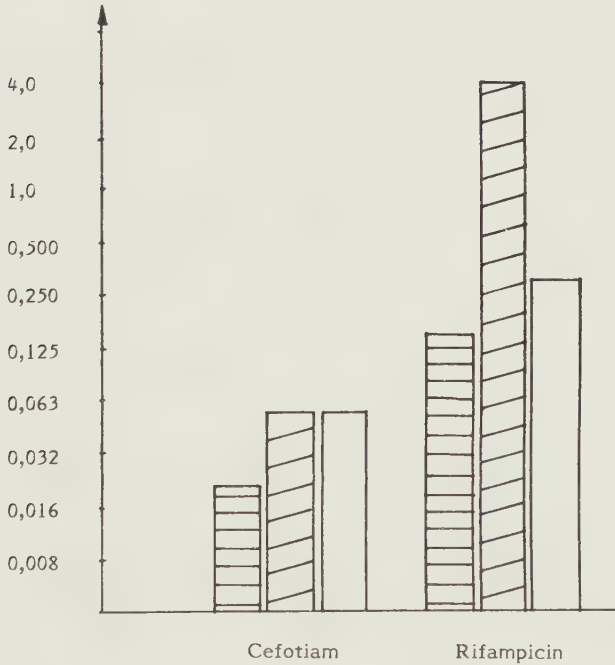


Abb. 4 Geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentration von fünf *Neisseria gonorrhoeae*-Stämmen unter subinhibitorischen Konzentrationen von Rifampicin und Cefotiam. ($T = 40$; $p < 0,01$)

-  mittlere Empfindlichkeit zu Beginn des Experiments
-  mittlere Empfindlichkeit nach dem Resistenzsteigerungsversuch
-  mittlere Empfindlichkeit der Vergleichsstämme nach wiederholter Passage auf hemmstofffreiem Nährboden

tration.

Berücksichtigt man die Ergebnisse der Vergleichsgruppe am Ende der Versuche, so ist die mittlere minimale Hemmkonzentration in der Rifampicin-Gruppe etwa zwölfmal größer (Tab. 1 u. 3). Zwischen Vergleichs- und Cefotiam-Gruppe findet sich kein Unterschied (Tab. 4 u. 6, Abb. 4).

Die statistische Hypothesenprüfung bekräftigt:

Mit und ohne Berücksichtigung der Vergleichsgruppe ergibt sich mit $T = 40$ und $p < 0,01$ unter Rifampicin ein Anstieg der Resistenz, nicht aber unter Cefotiam.

4.2 Veränderungen in der Empfindlichkeit gegenüber weiteren Antibiotika

4.2.1 Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Rifampicin-Gruppe

Die Gonokokken der Rifampicin-Gruppe waren nach den Experimenten gegenüber den Beta-Lactam-Antibiotika und gegenüber Tetracyclin weniger empfindlich. Das geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentration betrug bei Penicillin etwa das Fünffache, bei Cefotiam, Ceftizoxim und Cefotetan etwa das Dreifache und bei Tetracyclin etwa das Zweifache der Ausgangskonzentration (Tab. 7). Keine Veränderung fanden sich beim Streptomycin und beim Spectinomycin nur eine geringe. Die fünf Stämme verhielten sich unterschiedlich (Abb. 5). Beim Stamm 7022/81 lagen die größten Differenzen zwischen der anfänglichen und der abschließenden minimalen Hemmkonzentration zu beobachten. Gegenüber Penicillin stieg sie von 0,016 mg/l auf 2,0 mg/l., gegenüber Cefotiam von 0,008 mg/l auf 0,125 mg/l. Die Veränderungen beim Stamm 9520/81 waren weniger ausgeprägt. Bei den restlichen Stämmen ergaben sich keine Unterschiede zur Empfindlichkeit am Anfang, wenn man Veränderungen um eine Verdünnungsstufe dem Ablesefehler zuschreibt. Fünf Subkulturen auf hemmstofffreiem Nährboden beeinflussten die minimalen Hemmkonzen-

trationen nicht unter der genannten Voraussetzung.

Bei allen Stämmen verhinderten 0,125 mg/l Cefotiam oder 0,008 mg/l Ceftizoxim das Wachstum. Zu gleichem Erfolg führten auch 1,0 mg/l Cefotetan oder Tetracyclin, während bei Penicillin 2,0 mg/l notwendig waren. Die Vermehrung konnte man bei allen Stämmen mit 64,0 mg/l Streptomycin oder Spectinomycin hemmen.

Minimale Hemmkonzentration

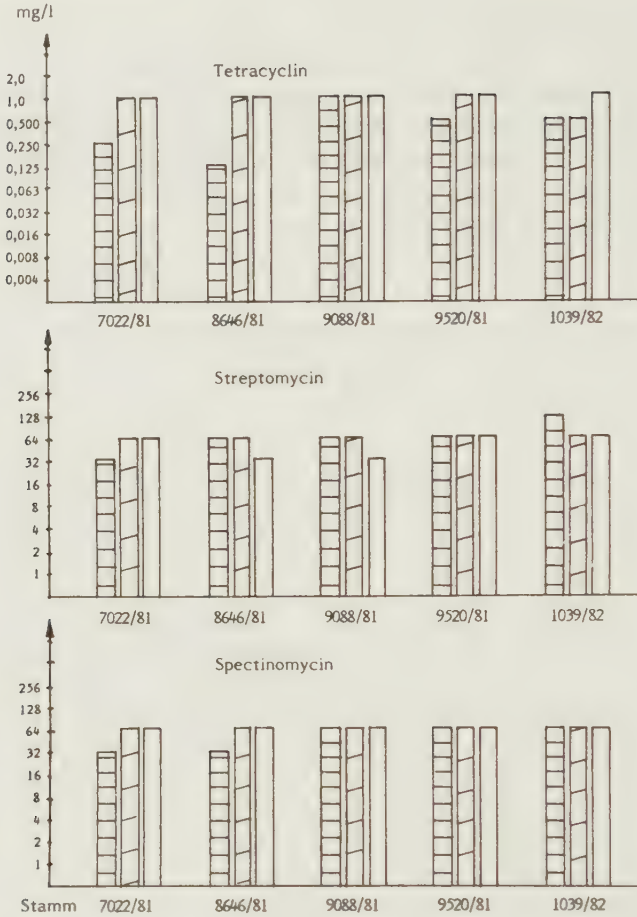


Abb. 5 Empfindlichkeit gegenüber sieben weiteren Antibiotika von fünf *Neisseria gonorrhoeae*-Stämmen, die wiederholt unter subinhibitorischen Konzentrationen von Rifampicin kultiviert wurden.

- ☐ Minimale Hemmkonzentration zu Beginn
- ☐ Minimale Hemmkonzentration nach dem Resistenzsteigerungsversuch unter subinhibitorischen Konzentrationen von Rifampicin
- ☐ Minimale Hemmkonzentration nach fünf weiteren Subkulturen auf hemmstofffreiem Nährboden

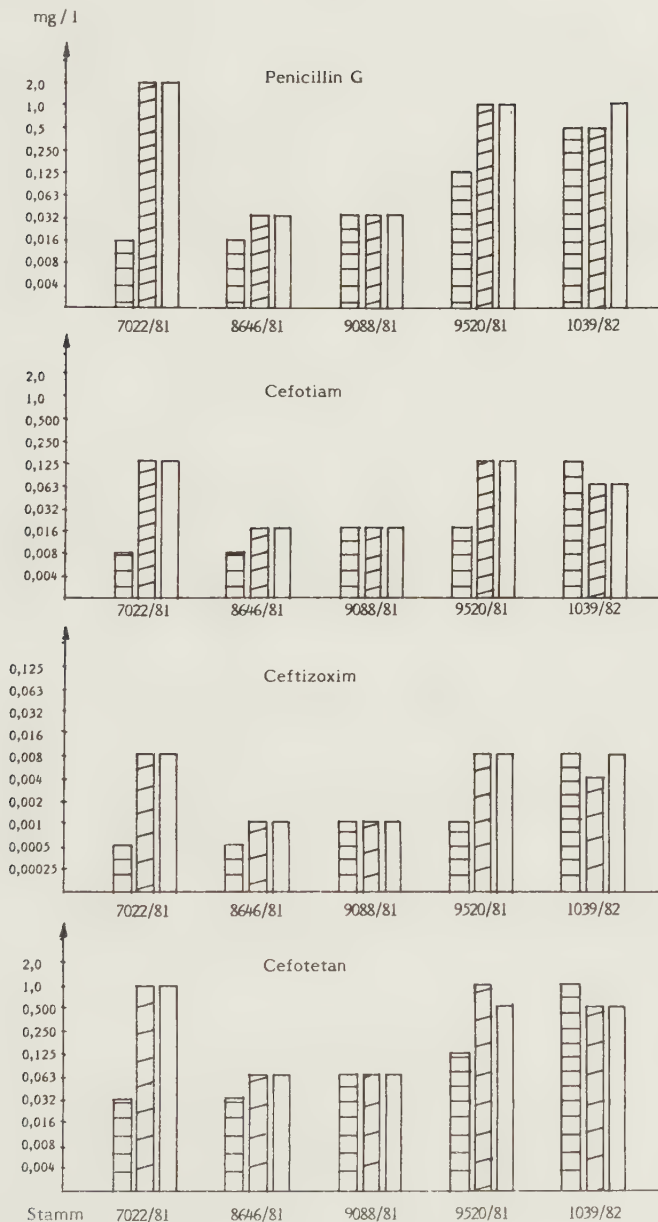


Abb. 5 (Fortsetzung)

Tab. 7

Empfindlichkeit gegenüber sieben weiteren Antibiotika bei den Stämmen der Rifampicin-Gruppe:

Geometrische Mittel der Minimalen Hemmkonzentrationen von 5 *Neisseria gonorrhoeae*-Stämmen, die unter subinhibitorischen Konzentrationen von Rifampicin wiederholt wurden

Antibiotikum	geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentrationen (mg/l)		
	zu Beginn	nach dem Resistenzstei- gerungsversuch	nach 5 Kulturen auf hemmstoff- freiem Nährmedium
Penicillin G	0,055	0,252	0,290
Cefotiam	0,018	0,048	0,048
Ceftizoxim	0,001	0,003	0,003
Cefotetan	0,096	0,288	0,252
Tetracyclin	0,379	0,871	1,0
Streptomycin	64,0	64,0	48,503
Spectinomycin	48,503	64,0	64,0

4.2.2 Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Cefotiam-Gruppe

Nach den Selektionsexperimenten mit Cefotiam waren die Gonokokken gegen andere Beta-Lactam-Antibiotika und gegen Tetracyclin widerstandsfähiger. Das geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentrationen stieg gegenüber dem Ausgangswert bei Ceftizoxim auf das Fünffache, bei Penicillin auf das Dreifache und bei Cefotetan und Tetracyclin auf das Doppelte. Bei Rifampicin, Streptomycin und Spectinomycin kam es zu keinen Veränderungen der mittleren minimalen Hemmkonzentration (Tab. 8).

Die fünf Stämme reagierten unterschiedlich bei den einzelnen Antibiotika (Abb. 6). Mit 0,016 mg/l Ceftizoxim konnten alle Stämme gehemmt werden, wobei Stamm 1039/82 der widerstandsfähigste war. Bei Penicillin reichten 2,0 mg/l und bei Cefotetan 0,5 mg/l, um die Vermehrung zu verhindern. Vier von fünf Stämmen überlebten 1,0 mg/l Tetracyclin nicht. Die gleiche Konzentration und weniger genügte bei Rifampicin für alle Stämme, während bei Streptomycin und Spectinomycin 64,0 mg/l notwendig waren.

Nach fünf aufeinanderfolgenden Passagen auf hemmstofffreiem Nährboden veränderte sich die minimale Hemmkonzentration nur bei Stamm 1039/82 und bei Stamm 9520/81: bei letzterem bedurfte es nach den Subkulturen 0,250 mg/l Rifampicin anstelle von 0,125 mg/l. Bei Stamm 1039/82 genügten nach den Subkulturen schon 0,125 mg/l Penicillin zur Hemmung; vorher waren 2,0 mg/l notwendig. Beim gleichen Stamm stieg die minimale Hemmkonzentration von 0,016 mg/l auf 0,125 mg/l Ceftizoxim; sie sank von 0,5 mg/l Cefotetan auf 0,250 mg/l und von 64,0 mg/l Streptomycin auf 32,0 mg/l. Schwankungen von einer Verdünnungsstufe liegen im Bereich des Ablesefehlers.

Minimale Hemmkonzentration
(mg/l)

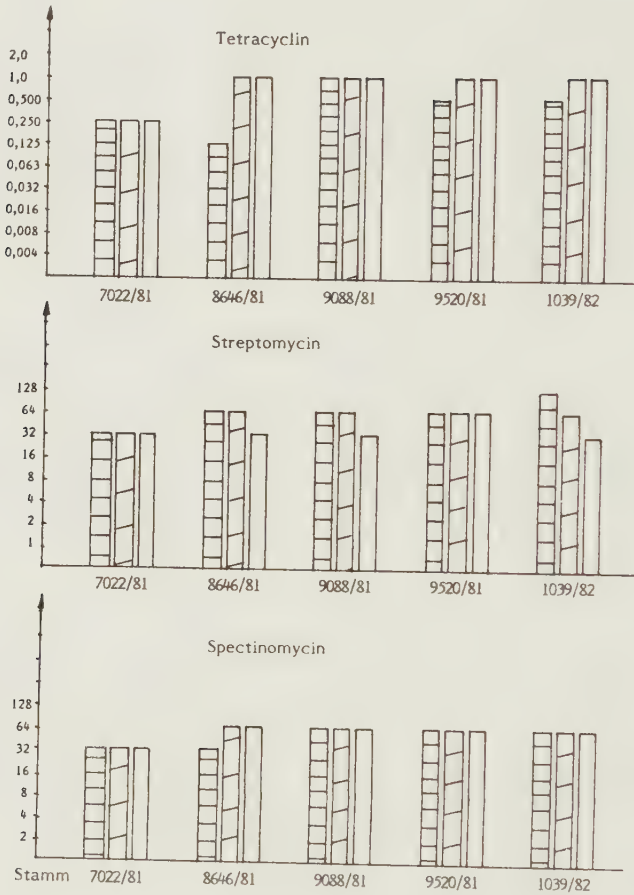


Abb. 6 Empfindlichkeit gegenüber sieben weiteren Antibiotika von fünf *Neisseria gonorrhoeae*-Stämmen, die wiederholt unter subinhibitorischen Konzentrationen von Cefotiam kultiviert wurden.

- Minimale Hemmkonzentration zu Beginn
- ▨ Minimale Hemmkonzentration nach dem Resistenzsteigerungsversuch unter subinhibitorischen Konzentrationen von Cefotiam
- Minimale Hemmkonzentration nach fünf weiteren Subkulturen auf hemmstofffreiem Nährmedium

Minimale Hemmkonzentration
(mg/l)

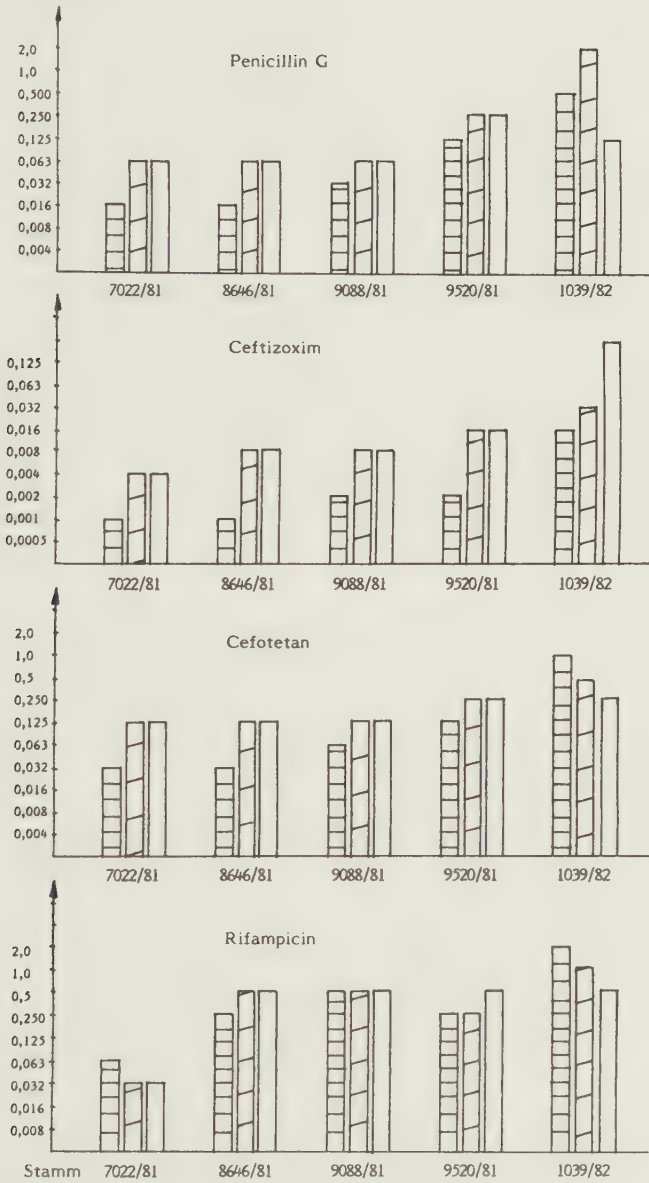


Abb. 6 (Fortsetzung)

Tab. 8

Empfindlichkeit gegenüber sieben weiteren Antibiotika bei den Stämmen der Cefotiam-Gruppe:

Geometrische Mittel der Minimalen Hemmkonzentrationen von 5 **Neisseria gonorrhoeae**-Stämmen, die unter subinhibitorischen Konzentrationen von Cefotiam wiederholt kultiviert wurden

Antibiotikum	geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentrationen (mg/l)		
	zu Beginn	nach dem Resistenzstei- gerungsversuch	nach 5 Kulturen auf hemmstoff- freiem Nährmedium
Penicillin G	0,055	0,166	0,095
Ceftizoxim	0,001	0,005	0,008
Cefotetan	0,096	0,189	0,165
Rifampicin	0,144	0,166	0,144
Tetracyclin	0,379	0,758	0,758
Streptomycin	64,0	55,715	36,758
Spectinomycin	48,503	55,715	55,715

4.2.3 Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Vergleichsgruppe

Auch die Gonokokken der Vergleichsgruppe waren nach den Experimenten zum Teil weniger empfindlich. Das geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentrationen war nachher bei Ceftizoxim fünfmal so groß wie vorher; bei Penicillin, Cefotiam, Cefotetan, Tetracyclin und Rifampicin betrug es nachher etwa das Zwei- bis Dreifache. Weder beim Streptomycin noch beim Spectinomycin waren wesentliche Änderungen zu beobachten (Tab. 9). Stabile Hemmkonzentrationen zeigte Stamm 1039/82. Die anderen verhielten sich unterschiedlich; höhere Antibiotikakonzentrationen waren vor allem bei den Stämmen 7022/81 und 8646/81 notwendig (Abb. 7).

Mit 1,0 mg/l Tetracyclin oder Rifampicin konnten alle Stämme am Wachstum gehindert werden. Dazu reichten auch 0,5 mg/l Penicillin oder Cefotetan aus; bei Ceftizoxim genügten 0,008 mg/l und bei Cefotiam 0,125 mg/l. Von Streptomycin und Spectinomycin benötigte man dagegen 64,0 mg/l (Abb. 7).

4.2.4 Vergleich der drei Gruppen bei den Veränderungen in der Empfindlichkeit gegenüber weiteren Antibiotika

Im Verlauf der Experimente nahm die Sensitivität der Gonokokken ab, die geometrischen Mittel der minimalen Hemmkonzentrationen stiegen (Tab. 10). Bei Streptomycin und Spectinomycin fanden sich kaum voneinander abweichende Empfindlichkeiten bei den fünf Stämmen. Am Ende der Versuchsreihe lag die höchste minimale Hemmkonzentration bei 64,0 mg/l.

Die mittleren Hemmkonzentrationen nahmen gegenüber den Ausgangswerten auf das Zwei- bis Fünffache zu. Gegenüber Tetracyclin und Cefotiam nahm die Empfindlichkeit weniger ab, vergleichsweise stärker aber gegenüber Ceftizoxim. Die Veränderungen bei den restlichen Antibiotika liegen zwischen diesen Extremen.

Gegenüber den verschiedenen Antibiotika waren die Gonokokken in den einzelnen Gruppen unterschiedlich widerstandsfähig, die entsprechenden mittleren Hemmkonzentrationen schwankten. Unter Cefotiam und Tetracyclin streuten sie wenig, unter Penicillin, Cefotetan und Rifampicin mehr.

In den drei Versuchsreihen nahm die Widerstandsfähigkeit der Gonokokken mit etwa gleicher Verteilung zu.

Mit 0,005 mg/l Ceftizoxim und etwa 0,05 mg/l Cefotiam kann die Vermehrung der Gonokokken im Mittel verhindert werden. Weniger als 0,3 mg/l Penicillin oder Cefotetan sind ebenso erfolgversprechend; bei Tetracyclin sind etwa 0,9 mg/l notwendig. Nicht Rifampicin-resistente Stämme lassen sich mit 0,4 mg/l des genannten Antibiotikums hemmen. Die Angaben stellen Mittelwerte dar.

Die maximal gemessenen minimalen Hemmkonzentrationen sind in Tab. 11 verzeichnet.

Tab. 9

Empfindlichkeit gegenüber sieben weiteren Antibiotika bei den Stämmen der Vergleichsgruppe:

Geometrische Mittel der Minimalen Hemmkonzentrationen von 5 **Neisseria gonorrhoeae**-Stämmen, die wiederholt auf hemmstofffreiem Nährmedium kultiviert wurden

Antibiotikum	geometrische Mittel der minimalen Hemmkonzentrationen (mg/l)	
	zu Beginn	nach wiederholter Kultur auf hemm- stofffreiem Medium
Penicillin G	0,055	0,144
Cefotiam	0,018	0,055
Ceftizoxim	0,001	0,005
Cefotetan	0,096	0,218
Rifampicin	0,144	0,330
Tetracyclin	0,379	0,871
Streptomycin	64,0	64,0
Spectinomycin	48,503	64,0

Minimale Hemmkonzentration

(mg/l)

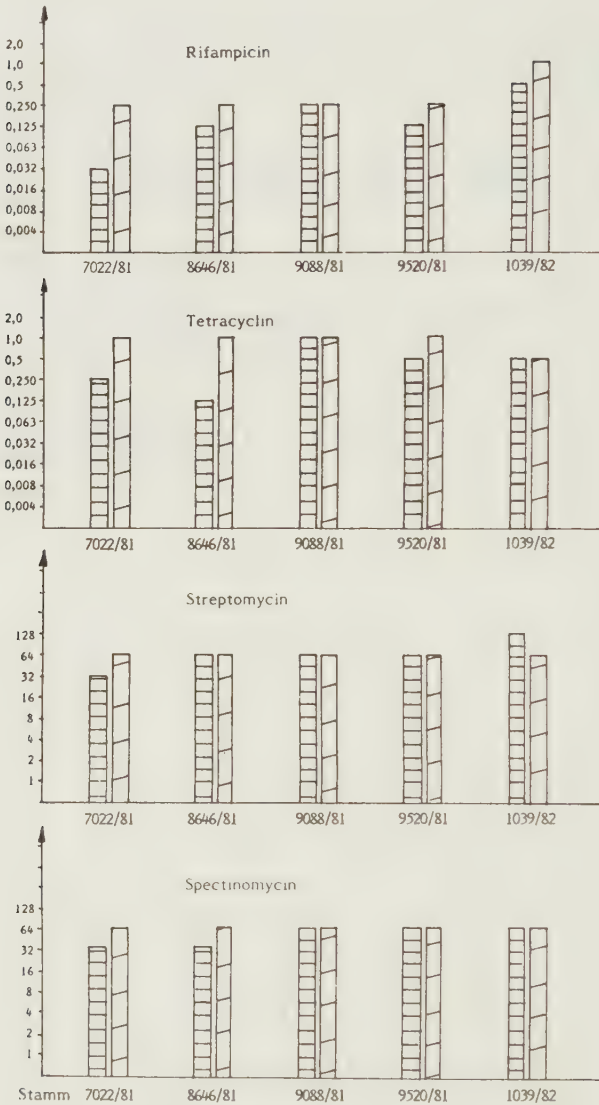


Abb. 7 Empfindlichkeit gegenüber sieben weiteren Antibiotika von fünf *Neisseria gonorrhoeae*-Stämmen, die wiederholt auf hemmstofffreiem Nährmedium kultiviert wurden.

■ Minimale Hemmkonzentration zu Beginn

▨ Minimale Hemmkonzentration nach dem Versuchsende

Minimale Hemmkonzentration

(mg/l)

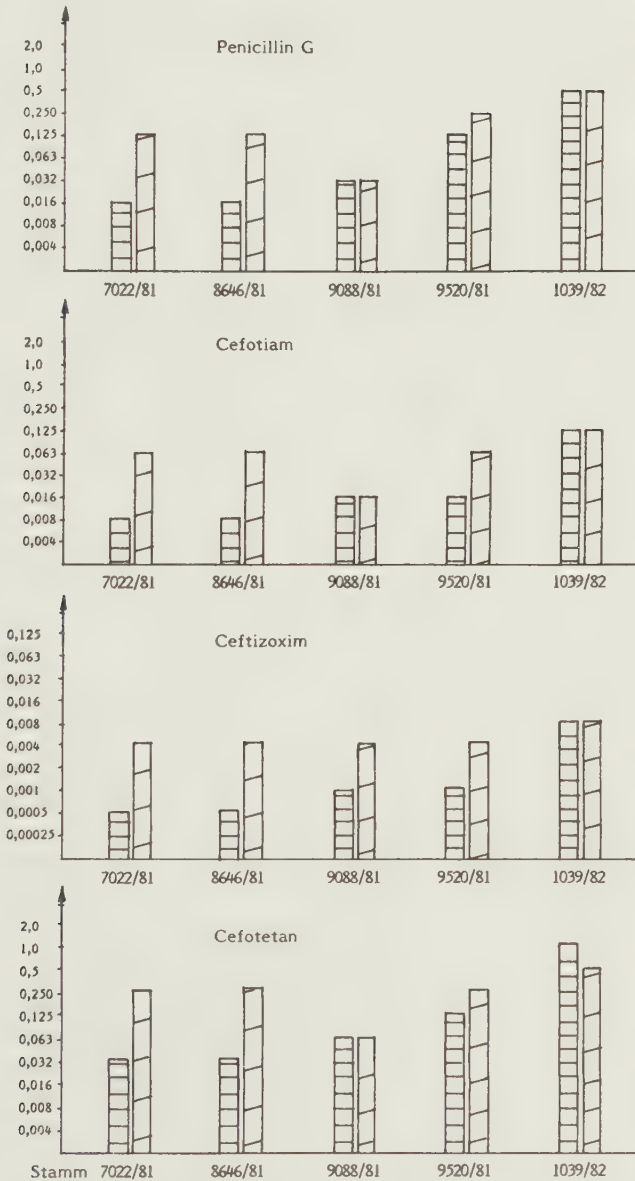


Abb. 7 (Fortsetzung)

Tab. 10

Mittlere Empfindlichkeit gegenüber acht Antibiotika in den drei Gruppen zu Beginn und nach dem Resistenzsteigerungsversuch

Antibiotikum	geometrisches Mittel der minimalen Hemmkonzentration (mg/l).			
	zu Beginn	Rifampicin- gruppe	Cefotiam- gruppe	Vergleichs- gruppe
Penicillin G	0,055	0,252	0,166	0,144
Cefotiam	0,018	0,048	0,055	0,055
Ceftizoxim	0,001	0,003	0,005	0,005
Cefotetan	0,096	0,288	0,189	0,218
Rifampicin	0,144	4,0	0,166	0,330
Tetracyclin	0,379	0,871	0,758	0,871
Streptomycin	64,0	64,0	55,715	64,0
Spectinomycin	48,503	64,0	55,715	64,0

Tab. 11

Maximale und minimale Werte der minimalen Hemmkonzentration für die acht Antibiotika aus den Experimenten mit fünf **Neisseria gonorrhoeae**-Stämmen

Antibiotikum	Minimale Hemmkonzentration (mg/l)	
	Minimalwert	Maximalwert
Penicillin G	0,016	2,0
Cefotiam	0,002	0,125
Ceftizoxim	0,0005	0,125
Cefotetan	0,032	1,0
Rifampicin	0,016	8,0
Tetracyclin	0,125	1,0
Streptomycin	32,0	128,0
Spectinomycin	32,0	64,0

5. DISKUSSION

Die Gonorrhoe wurde mit fast allen neuen Antibiotika behandelt, soweit die Erreger primär empfindlich waren. Allerdings ließ die Wirksamkeit der Substanzen oft schon nach wenigen Jahren nach: so berichtete Felke schon 1938 über Resistenzen bei Sulfonamiden. 1959 schrieb Röckl über Penicillin:

"Es besteht kein Zweifel darüber, daß eine, wenn auch langsame und über Jahre sich erstreckende Abnahme der Empfindlichkeit der Gonokokken zu verzeichnen ist." Er vermutete, "daß eine zunehmende Selektion weniger empfindlicher Stämme im Gange zu sein scheint".

Dies bestätigten weitere Untersuchungen von Röckl (1962), und Storck und Schwarz-Speck (1969).

Weltweit müssen Ärzte und Patienten heute mit **Neisseria gonorrhoeae**-Stämme rechnen, die chromosomal resistent sind gegen Streptomycin und Tetracyclin, gegen Erythromycin und Chloramphenicol, gegen Rifampicin und andere Antibiotika (Reyn 1969, Willcox 1970, Malmborg et al. 1971, Sparling 1977).

Auch in Laborexperimenten gelang es, die Resistenz von Gonokokken in Anwesenheit von Antibiotika zu steigern. Miller und Bohnhoff erhöhten die Resistenz gegen Penicillin (1945) und gegen Streptomycin (1946), indem sie **Neisseria gonorrhoeae** wiederholt unter subinhibitorischen Konzentrationen züchteten. Ähnlich verfahren Marcuse und Hussels (1954). Sie fanden sowohl zunehmende als auch abnehmende Empfindlichkeit gegenüber Penicillin. Meyer-Rohn (1958) untersuchte das "Adaptationsvermögen" an Penicillin, Streptomycin, Tetracyclin und andere Antibiotika mit unterschiedlichen Ergebnissen. Über Penicillin- und Tetracyclin-resistente Gonokokken berichteten auch Maier et al. (1974). Bei anderen gramnegativen Bakterien steigerten Murry und Mitarbeiter (1946) die Streptomycin-Resistenz.

5.1 Diskussion der Methode

Jede Bakterienpopulation besteht aus Subpopulationen mit Keimen unterschiedlicher Widerstandsfähigkeit. Resistente lassen sich mit antimikrobiellen Wirkstoffen selektieren, wenn wachstumshemmende Konzentrationen ausreichend lange einwirken (Demerec 1948). Dieses Prinzip wandten alle vorher genannten Untersucher an, doch benützten sie verschiedene Nährmedien, Inokula und Bebrütungszeiten. Die Wachstumsstufen, von denen weiterkultiviert wurde, wichen ebenfalls voneinander ab.

Die einzelnen Versuchsbedingungen werden im Folgenden näher diskutiert.

Wie unter 4.1.1 und 5.2.1.1 dargestellt, ergaben sich unter subinhibitorischen Rifampicin-Konzentrationen erhebliche Resistenzsteigerungen. Dies beweist, daß die hier angewandte Methode zur Überprüfung des Resistenzsteigerungspotentials geeignet ist. Unter subinhibitorischen Konzentrationen von Cefotiam nahm die Empfindlichkeit der Gonokokken in geringem Umfang ab (s. Kap. 4.1.2 und 5.2.1.2). Die hier angewandte Methode erlaubt also, erhebliche Unterschiede im Resistenzsteigerungspotential verschiedener Antibiotika zu erkennen.

Die unter Rifampicin und Cefotiam gefundenen Effekte sind keineswegs allein auf die wiederholte Passagierung zurückzuführen. Dies zeigen die Ergebnisse einer Vergleichsgruppe, in der die Gonokokken auf hemmstofffreiem Nährmedium wiederholt passagiert wurden (s. Kap. 4.2.3 und 5.1.6).

5.1.1 Zusammensetzung des Nährmediums

Moderne Nährmedien können die gehobenen Ansprüche von **Neisseria gonorrhoeae** vollständig befriedigen. Früher gab es keine qualitativ und quantitativ standardisierten Nährmedien, so daß es leicht zu doppelter Selektion kommen konnte: es entstanden sogenannte "Hungermutanten", die nur scheinbar hoch resistent waren. Ihre Unempfindlichkeit führte man fälschlich auf Selektion durch einen Hemmstoff zurück. Auf diese Weise fand Hämel (1955) Sulfonamid- und Penicillin-resistente Gonokokken. Unausgewogene Nährmedien begünstigten zum Teil die Ergebnisse von Miller und Bohnhoff (1945, 1946), Meyer-Rohn (1958) und

die von Marcuse und Hussels (1954).

5.1.2 Größe des Inokulums

Bakterien mutieren pro Zellgeneration mit einer Häufigkeit von 10^{-5} bis 10^{-10} (Drews 1979). Von 10^8 Gonokokken mutiert unter Rifampicin einer und unter Spectinomycin einer unter 10^{10} (Sarubbi et al. 1974). Verwendet ein Untersucher sehr hohe Inokula von etwa 10^{10} koloniebildenden Zellen, so findet er eher resistente. "Die absolute Zahl von Mutanten in einer Kultur wird umso größer sein, je mehr Zellen sich in der Kultur befinden" (Drews 1979). In einer Bebrütungszeit von 24 Stunden teilen sich die Gonokokken vielfach, so daß bei dieser hohen Einsaat sicher resistente Keime entstehen können.

Alle genannten Autoren vor 1960 definierten ihre Inokula über die verwendete Impföse. Die Einsaat umfaßt damit mehr als 10^{10} koloniebildende Zellen. Maier und Mitarbeiter (1974) inokulierten 10^8 bis 10^9 Zellen. In der vorliegenden Arbeit umfaßt das Inokulum etwa 5×10^4 koloniebildende Zellen. Bei dieser vergleichsweise kleinen Einsaat sind Persister kaum zu erwarten. (Persister sind ruhende Keime, die in einem an essentiellen Substraten verarmten Nährmedium auch letale Wirkstoffkonzentrationen überleben (Drews 1979).) Gleichzeitig kann die absolute Zahl von Mutanten so gering sein, daß sie während mehrerer Versuchsschritte unentdeckt bleiben.

5.1.3 Bebrütungszeit

Die Bebrütungszeit kann Ergebnisse ähnlich beeinflussen wie die Größe des Inokulums. Bei exponentiellem Wachstum teilen sich Zellen in 48 Stunden etwa doppelt so oft wie in 24 Stunden. Resistente Zellen können sich stärker vermehren und leichter entdeckt werden.

Meyer Rohn (1958), Marcuse und Hussels (1954) bebrüteten die Gonokokken 48 Stunden, die anderen Untersucher 24 Stunden. Diese Zeit sollte nicht unterschritten werden. Lange Bebrütungszeiten mit großen Inokula können synergistisch wirken.

5.1.4 Einfluß der Wachstumsstufe, von der weiterkultiviert wird

Die subinhibitorische Konzentration eines Antibiotikums, von der abgeimpft und weiterkultiviert wird, beeinflußt das Ergebnis des Versuchs. Marcuse und Hussels (1954) züchteten zunächst Gonokokken der Grenzwachstumsstufe weiter (vgl. Abschnitt 3.2.2). Die Gonokokken starben innerhalb weniger Passagen ab. Kultivierten sie von der grenznächsten Wachstumsstufe ausgehend, so nahm die Empfindlichkeit der Gonokokken in den darauffolgenden Passagen ab.

Die höchsten Konzentrationen wurden von den Stämmen überlebt, die sich zwischen den Passagen mit Penicillin auf hemmstofffreien Nährmedien vermehren konnten. Deutlich penicillin- und streptomycinresistente Gonokokken beobachteten Miller und Bohnhoff (1945, 1946), indem sie nicht von der Grenzwachstumsstufe, sondern von Agarplatten mit "confluent growth" weiterimpften. Auf solchen Platten liegt die Antibiotikumkonzentration um mehrere Titerstufen unter der minimalen Hemmkonzentration.

Meyer-Rohn übertrug Kokken der Grenzwachstumsstufe. Dabei nahm die Empfindlichkeit der Stämme gegenüber Tetracyclin ab und gegenüber Penicillin blieb sie unverändert. Bei Streptomycin und Erythromycin fand er steigende Hemmkonzentrationen. Maier und Mitarbeiter (1974) übertrugen Gonokokken von der Grenzwachstumsstufe auf Agarplatten mit gleichen und höheren Konzentrationen von Penicillin und Tetracyclin. Die Gonokokken wurden resistent.

Im allgemeinen nimmt die Resistenz der Gonokokken zu, wenn sie auf festen Nährböden mit submaximalen subinhibitorischen Antibiotikumkonzentrationen passagiert werden und auf jede derartige Passage eine weitere ohne Antibiotikum im Nährboden folgt. Ohne "Erholungspause" überleben die Gonokokken nur wenige Passagen.

5.1.5 Empfindlichkeitsbestimmung

Meyer-Rohn (1958), Marcuse und Hussels (1954) bestimmten die Empfindlichkeit der Gonokokken in einem ersten Schritt größenordnungsmäßig. Anschließend ermittelten sie die minimale Hemmkonzentra-

tion mit Hilfe fein abgestufter Titer im vorher gefundenen Bereich. Bei diesem Verfahren teilen sich die Zellen öfter, denn sie werden länger bebrütet. Resistente Mutanen können sich stärker vermehren. Der Selektionsdruck ist verstärkt und wird länger aufrecht erhalten. Die Untersucher erwarteten genauere Ergebnisse, verloren aber Erkenntnisse über den Verlauf der Resistenzentwicklung. Ein Teil der möglichen Mutanen wurde ausgefiltert.

5.1.6 Vergleichsgruppe (Passagen auf hemmstofffreiem Nährmedium)

Einflüsse, die nicht auf das selektierende Antibiotikum zurückgeführt werden dürfen, sollen mit einer Vergleichsgruppe aufgedeckt werden. Ausgehend von einer einzigen Kultur eines jeden Stammes, wird sein Verhalten unter subinhibitorischen Antibiotikakonzentrationen und auf hemmstofffreiem Nährmedium beobachtet. In beiden Versuchsreihen werden die Kokken bei Übertragungen, Bebrütung und Suspendierung gleich behandelt. Damit ist ein intraindividueller Vergleich möglich. Dieses Verfahren wurde bei Resistenzuntersuchungen bisher nicht beschrieben.

Die Versuchsergebnisse zeigten: wiederholte Passagen auf Nährböden ohne Antibiotikum führen nicht zu einer starken Selektion unempfindlicher Stämme. Dennoch nimmt die Empfindlichkeit der Gonokokken in geringem Maße ab. Diese Beobachtung widerspricht den Berichten von Reyn (1961) und Sparling (1966). Sie beobachteten über etwa 90 Subkulturen keine Veränderung der Empfindlichkeit.

5.2 Diskussion der Ergebnisse

5.2.1 Diskussion der Resistenzsteigerungsversuche

5.2.1.1 Resistenzsteigerungsversuche mit Rifampicin

Bei den fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämmen trat keine rasche Resistenzsteigerung gegenüber Rifampicin ein. Tatsächlich führten subinhibitorische Rifampicinkonzentrationen zur Resistenzentwicklung nach dem fakultativen Ein-Schritt-Typ (Bryson u. Szybalski 1955, Zinsser 1960). Im Mittel stieg die minimale Hemmkonzentration von 0,144 mg/l auf 4,0 mg/l. Damit sind die

Gonokokken gegen Rifampicin absolut resistent (Thornsberry et al. 1983). Die Widerstandsfähigkeit steigt am stärksten bei den vergleichsweise empfindlichen Stämmen. Die erworbene Resistenz bleibt über fünf Subkulturen auf hemmstofffreiem Nährmedium stabil und beruht deshalb auf chromosomalen Veränderungen (Drews 1979) (Tab. 1). In der Vergleichsgruppe beträgt die mittlere minimale Hemmkonzentration abschließend 0,330 mg/l (Tab. 3). Die statistische Prüfung bekräftigte, daß die Resistenz der Gonokokken zugenommen hat.

Die vorliegenden Beobachtungen bestätigen therapeutische Erfahrungen von Malmborg et al. (1971): nach mißlungener Behandlung mit Rifampicin waren Gonokokkenstämme in vitro deutlich weniger empfindlich als vor der Therapie. Nach erfolgloser Behandlung maß er minimale Hemmkonzentrationen von über 10 mg/l Rifampicin. Gordts et al. (1982) fand spontan mutierte Gonokokken, die 100 mg/l Rifampicin ertrugen. Bei bis zu 500 mg/l Rifampicin wuchsen solche, die Sarubbi et al. (1974) beobachtete. Beide Untersucher benutzten große Inokula und besonders wachstumsfördernde Kulturbedingungen mit Bebrühtungszeiten von 48 Stunden. Ihre Ergebnisse lassen sich zum Teil mit dem "Inokulum-Effekt" erklären: Bei Rifampicin steigt die gemessene Hemmkonzentration mit der Einsaat (Otten et al. 1975).

Vermutlich führten unspezifische Mutationen in den Experimenten zur Resistenz (Sparling 1977). Antibiotikum-spezifische Mutationen erfordern höhere Hemmkonzentrationen, wie Gordts et al. (1982) und Sarubbi et al. (1974) beobachteten.

5.2.1.2 Resistenzsteigerungsversuche mit Cefotiam

Bei den fünf *Neisseria-gonorrhoeae*-Stämmen nahm die Empfindlichkeit gegenüber Cefotiam in geringem Maße ab. Resistent gegen dieses Antibiotikum wurde keiner der Stämme.

Im Mittel stieg die minimale Hemmkonzentration bei den fünf Stämmen von 0,018 mg/l auf 0,055 mg/l. Nach fünf weiteren Passagen auf hemmstofffreiem Nährmedium fiel sie geringfügig auf 0,042 mg/l Cefotiam (Tab. 4). Die Ergebnisse in der Cefotiam- und der Vergleichsgruppe stimmen überein. Eine Resistenzsteigerung, die auf das Antibiotikum selbst zurückzu-

führen wäre, läßt sich nicht erkennen. Nach 26 Übertragungen vermehrte sich keiner der Stämme bei 0,128 mg Cefotiam pro l und darüber.

Diese Hemmkonzentration war auch zu Beginn die maximale. Alles spricht für eine begrenzte Selektion von etwas weniger empfindlichen Keimen, die wohl den übrigen Versuchsbedingungen anzulasten ist. Es entwickelte sich keine Resistenz, auch keine vom Viel-Schritt-Typ, wie sie beim Penicillin beobachtet wurde (Zinsser 1960).

Nach den Erfahrungen früherer Untersucher werden Gonokokken der grenznächsten Wachstumsstufe und darunter eher widerstandsfähig (Marcuse u. Hussels 1954). Die vorliegenden Untersuchungen bestätigen dies nicht: Der Verlauf bei Stamm 7022/81 unterscheidet sich nicht von dem bei den anderen Stämmen, obwohl zweimal Kokken grenznächster Wachstumsstufen übertragen wurden. In der dritten Passage des gleichen Stammes nahm die Empfindlichkeit stark zu nach Übertragung vom nichtselektiven, hemmstofffreiem Nährmedium auf ein selektives mit Cefotiam. Die empfindlichen Zellen dieses Stammes gingen dabei offenbar zugrunde. Das gleiche Phänomen beschrieben Taylor und Phillips (1979) für ein Medium mit Vancomycin, Colistin und Nystatin.

Bisher wurden keine Cefotiam-resistenten Gonokokkenstämme gefunden (Braveny und Machka 1980, Kahn et al. 1982, Korting 1984). Diese Tatsache sollte im Zusammenhang mit den vorliegenden Ergebnissen erwähnt werden.

5.2.2 Diskussion von Veränderungen in der Empfindlichkeit gegenüber anderen Antibiotika

5.2.2.1 Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Rifampicin-Gruppe

"Rifampicin (zeigt) keine Parallelresistenz mit anderen antimikrobiellen Wirkstoffen" (Otten et al. 1975). Nach neueren Untersuchungen gilt dies auch gegenüber den Cephalosporinen (Gordts et al. 1982). Ich erwartete demzufolge nach 25 Passagen unter subinhibitorischen Rifampicin-Konzentrationen keinen vollständigen Verlust der Empfindlichkeit gegenüber anderen

Antibiotika. Nach den Versuchen vermehrten sich die fünf **Neisseria gonorrhoeae**-Stämme bei höheren Konzentrationen von Penicillin G, Cefotiam, Ceftizoxim, Cefotetan und Tetracyclin. Die mittleren Hemmkonzentrationen nahmen zu (Tab. 7). Dafür gibt es mehrere Erklärungen: zufälliges Zusammentreffen, Selektion und genetische Veränderungen.

Die Frage nach dem zufälligen Zusammentreffen vielfach widerstandsfähiger Stämme ließe sich mit statistischen Methoden beantworten. Davon mußte abgesehen werden, da die Daten voneinander abhängig sind. Es könnte sich zufällig Falsches ergeben. Eine Selektion mäßig empfindlicher Keime ist möglich: bei den Gonokokken der Vergleichsgruppe nahmen die mittleren Hemmkonzentrationen zu, nachdem sich die Stämme wiederholt auf hemmstofffreiem Nährmedium vermehrten.

Genetische Veränderungen antibiotikum-unspezifischer Art beschrieben Sparling und Maness (1977 bzw. 1973): In begrenztem Umfang steigerten Gonokokken ihre Widerstandsfähigkeit gleichzeitig gegenüber Penicillin G, Tetracyclin und Rifampicin, nicht aber gegenüber Streptomycin und Spectinomycin. Dies stimmt mit den vorliegenden Untersuchungsergebnissen überein. Bei Streptomycin und Spectinomycin waren keine Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den fünf Stämmen zu finden.

Penicilline und Cephalosporine wirken prinzipiell über den gleichen Mechanismus (Simon u. Stille 1982), so daß die Erklärung von Maness (1973) und Sparling (1977) für Cephalosporine zutreffen kann. Untersuchungen des Genoms in den fünf Gonokokkenstämmen sind notwendig, um diese Frage zu klären.

Über fünf Subkulturen auf hemmstofffreiem Nährmedium veränderten sich die mittleren Hemmkonzentrationen nur unwesentlich (Tab. 7), so daß die verringerte Empfindlichkeit wahrscheinlich auf chromosomalen Veränderungen beruht (Sparling 1966).

5.2.2.2 Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Cefotiam-Gruppe

Wie bei Cefotiam erwartete ich auch bei den sieben weiteren Antibiotika keine Resistenz. Nach 25 Passagen lagen die mittleren minimalen Hemmkonzentrationen für die fünf Gonokokkenstämme bei Penicillin, Ceftrizoxim, Cefotetan und Tetracyclin höher als zu Beginn der Experimente. Nach fünf Kulturen auf hemmstofffreiem Nährmedium sanken sie bei Penicillin und Cefotetan geringfügig. Bei Ceftrizoxim stiegen sie noch weiter und bei Tetracyclin blieben sie unverändert. Resistente Gonokokken konnten nicht beobachtet werden (Tab. 8). Wie gegenüber Cefotiam wurden die Gonokokken auch gegenüber Tetracyclin etwas weniger empfindlich. Positive Korrelationen bezüglich der Sensitivität beschrieben Gordts et al. (1982), Simon u. Stille (1982) und Korting (1984) für Penicillin und Cephalosporine; bei Penicillin und Tetracyclin beobachteten Maier u. Mitarbeiter (1974) einen Zusammenhang.

Rifampicin und Spectinomycin waren von der Selektion widerstandsfähiger Zellen nicht betroffen. Die mittleren minimalen Hemmkonzentrationen veränderten sich nur wenig (Tab. 8). Parallelresistenzen zwischen Penicillin, Cephalosporinen und Spectinomycin treten nicht auf.

Gegenüber Cefotiam und Penicillin nahm die Widerstandsfähigkeit zu, dagegen sank sie gegenüber Streptomycin. Zwischen Penicillin und Streptomycin bestehen Korrelationen in der Empfindlichkeit (Maness u. Sparling 1973). Die mittlere Hemmkonzentration müßte eher zu- als abnehmen. Das entgegengesetzte Ergebnis in den Experimenten überrascht zunächst. Es beruht auf der steigenden Empfindlichkeit des Stammes 1039/82 (Abb. 6). Insgesamt veränderten sich die Empfindlichkeit der fünf Gonokokkenstämme gegenüber den anderen Antibiotika wie gegenüber Cefotiam selbst.

5.2.2.3 Veränderungen in der Empfindlichkeit bei den Stämmen der Vergleichsgruppe

Bei den fünf Gonokokkenstämmen der Vergleichsgruppe nahm die Empfindlichkeit gegenüber den Beta-Lactam-Antibiotika, Tetracyclin und Rifampicin etwas ab (Tab. 9). Bei Streptomycin und Spectinomycin fanden sich keine Veränderungen.

Wiederholte Übertragungen auf hemmstofffreiem Nährmedium führten zur Selektion etwas weniger empfindlicher Keime. Empfindliche Stämme forderten am Ende etwa gleiche Hemmkonzentrationen wie die widerstandsfähigeren.

Stellt man die Ergebnisse denen der Cefotiam-Gruppe gegenüber, so sind wesentliche Unterschiede nur beim Rifampicin zu finden (Tab. 10):

die mittlere minimale Hemmkonzentration liegt in der Vergleichsgruppe doppelt so hoch. Beim Penicillin genügten im Mittel geringere, bei Cefotetan, Tetracyclin, Streptomycin und Spectinomycin etwas höhere Hemmstoffkonzentrationen um Wachstum in der Vergleichsgruppe zu verhindern.

Höhere Konzentrationen von Penicillin, Cefotetan und geringere von Cefotiam und Ceftizoxim als in der Vergleichsgruppe waren in der Rifampicingruppe notwendig, um die Vermehrung der Gonokokken zu unterbinden (Tab. 10).

In den drei Gruppen nahm die Widerstandsfähigkeit der Gonokokken insgesamt zu, doch sind die Veränderungen ungleichmäßig verteilt und in ihrem Ausmaß begrenzt.

Die mittleren Hemmkonzentrationen der Vergleichsgruppe weichen nicht deutlich ab von denen der Rifampicin- und Cefotiamgruppe. Offenbar führt wiederholte Kultivierung ohne Antibiotikum im Nährmedium allein zur Selektion widerstandsfähigerer Keime. Die anfänglich niedrigeren minimalen Hemmkonzentrationen weisen darauf hin (Abb. 7, Tab. 10). Warum beobachteten Sparling (1966) und Reyn (1961) keine Veränderungen in der Empfindlichkeit nach bis zu 90 Subkulturen? Sparling arbeitete mit genetisch transformierten Gonokokken, deren Eigenschaften er genau kannte. Die genetisch festgelegten Eigenschaften der fünf Gonokokkenstämme in der vorliegenden Untersuchung streuten zu Beginn im Rahmen des biologisch Möglichen. Bestimmte Zellen wurden selektiert, und für ihre bevorzugte Vermehrung wurde gesorgt. Besonders gefördert wurden antibiotikumresistente Gonokokken. Frau Reyn sagt nichts über ihr Inokulum. Vermutlich verwendete sie eine Impföse. Ihr Inokulum ist damit um mehrere Zehnerpotenzen größer als 10^4 koloniebildende Keime. Die genetisch festgelegte Streuung der Eigenschaften blieb weitgehend erhalten. Der Selektionsdruck durch ein Antibiotikum fiel so geringer aus.

5.3 Klinische Bedeutung der Resistenzsteigerungsversuche

In der vorliegenden Untersuchung ist Cefotiam dem Rifampicin überlegen in der zuverlässigen Abtötung von **Neisseria gonorrhoeae**. Fünf ausgewählte Gonokokkenstämme entwickelten gegenüber Cefotiam keine Resistenz, wohl aber gegenüber Rifampicin. Nach 25 Passagen unter subinhibitorischen Rifampicin-Konzentrationen betrug die minimale Hemmkonzentration etwa das Zwölfwache der Ausgangskonzentration gegenüber den Stämmen der Vergleichsgruppe. Dies entspricht absoluter Resistenz. Nach 25 Passagen unter subinhibitorischen Cefotiam-Konzentrationen war keine Veränderung in der Empfindlichkeit gegenüber der Vergleichsgruppe festzustellen. Unter therapeutischen Gesichtspunkten ist daher eine rasche Resistenzentwicklung gegenüber Cefotiam kaum zu erwarten (Naumann 1966).

Eine Infektion mit **Neisseria gonorrhoeae** wird heute in der Regel mit Penicillin G behandelt. Ein Teil dieser Kokken ist aber heute schon resistent gegen dieses Antibiotikum. Die Zahl resistenter Gonokokken, insbesondere solcher, die Beta-Lactamase produzieren, nimmt zu (Willcox 1970, Culliton 1976, Murray u. Moellering 1978). Wegen seiner zuverlässigen Wirkung und seiner guten Verträglichkeit empfehlen verschiedene Autoren Cefotiam als Basistherapeutikum gerade für die Therapie von Infektionen mit **Neisseria gonorrhoeae** (Lode 1982, Korting 1984).

Vor dem Hintergrund der hier gewonnen Ergebnisse kann dieses neue Cephalosporin ohne Bedenken bei Erkrankungen durch Gonokokken allgemein eingesetzt werden. Sollten weitere klinische Untersuchungen diese Auffassung untermauern, so könnte Cefotiam das Penicillin G in der Therapie der Gonorrhoe ersetzen.

Literaturverzeichnis:

Ashford W, Golash RG, Henning VG (1976) Penicillinaseproducing **Neisseria gonorrhoeae**. Lancet II: 657 - 658

Braveny I, Machka K (1980) Activity of Cefotiam (CGP 14221/E) against **Haemophilus influenzae**, **Neisseria gonorrhoeae**, and **Neisseria meningitidis**, including beta-lactamase-producing isolates, in-vitro. In: Nelson JD, Grassi C (eds.) (1980) Current Chemotherapy and Infectious Disease, Vol. 1, Washington DC, American Society for Microbiology

Bryson V, Szybalski W (1955) Microbial drug resistance.
in: Demerec (ed.) Advances in genetics, Vol. VII, Academic Press, New York, pp. 1 - 46

Culliton BJ (1976) Penicillin-resistant gonorrhea: New strain spreading worldwide. Science 194:1395 - 1397

Demerec M (1948) Origin of bacterial resistance to antibiotics. J Bacteriol 56:63 - 74

Cocumenta Geigy (1977) Wissenschaftliche Tabellen. 7. Auflage, Geigy Pharmazeutika, Wehr/Baden, S. 146 - 171

Drews J (1979) Grundlagen der Chemotherapie. Springer, Wien New York, S. 27 - 72 u. S. 211 - 249

Ericsson AE, Sherris JC (1971) Antimicrobial sensitivity testing. Report of an international collaborative study. Acta Pathol Microbiol Scand (B) (Suppl.) 217: 1 - 90

Felke H (1938) Die Wirkung der Sulfonamidverbindungen auf die Erreger der Gonorrhoe. Klin Wochenschr 17: 13 - 16

Felke H (1948) Der Gang der Chemoresistenz der Gonokokken 1937 bis 1944 und seine Ursachen. Dermatol Wochenschr 119: 106 - 110

Gordts B, Vanhoof R, Hubrechts JM, Dierichx R, Coignan H, Butzler JP (1982) In-vitro activity of 21 antimicrobial agents against **Neisseria gonorrhoeae** in Brussels.

Br J vener Dis 58: 23 - 28

Hallmann L, Burkhardt F (1974) Klinische Mikrobiologie. 4. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 67 - 70, 582 - 595

Hämel J (1955) Zum Problem der Bakterienresistenz bei Sulfonamiden und Penicillin. Med Klinik 50: 24 - 26

Immich H (1974) Medizinische Statistik. Schattauer, Stuttgart New York, S. 318 - 322, 327 - 332

Kahn MN, Siddiqui Y, Gruninger RP (1982) Comparative in-vitro activity of selected new beta-lactam antimicrobial agents against **Neisseria gonorrhoeae**. Br J vener Dis 58: 228 - 230

Korting HC (1984) In vitro susceptibility of recent isolates of *Neisseria-gonorrhoeae* to cephalosporins of different generations and Penicilling G: a comparative evaluation. Dermatologica 168: 67 - 72

Lode H (1982) Stellenwert der Cephalosporine in der klinischen Antibiotikatherapie. in: Lode H, Adam D (Hrsg.) (1982)

Cefotiam - Standortbestimmung eines Antibiotikums. Symposium München 1982. Excerpta Medica, Amsterdam, Oxford, Princeton: 118 - 124

Maier TW, Beilstein HR, Zubrzycki L (1974) Multiple antibiotic resistance in **Neisseria gonorrhoeae**. Antimicrob Agents Chemother 6: 22 - 28

Malmborg A-S, Molin L, Nyström B (1971) Rifampicin compared with Penicillin in the treatment of gonorrhea. Chemotherapy 16: 319 - 325

Maness MJ, Sparling PF (1973) Multiple antibiotic resistance due to a single mutation in **Neisseria gonorrhoeae**. J Infect Dis 128: 321 - 330

Marcuse K, Hussels H (1954) Zur Frage der Penicillinempfindlichkeit der Gonokokken. Dermat Wochenschr 130: 1031 - 1044

Meyer-Rohn J (1958) Experimentelle Untersuchungen zur Antibiotica-Resistenz von *Neisseria gonorrhoeae*. Hautarzt 9: 81 - 84

Miller CP, Bohnhoff M (1945) Studies on the action of Penicillin IV. Development of Penicillin-resistance by gonococcus.

Proc Soc Exp Biol Med 60: 354 - 356

Miller CP, Bohnhoff M (1946) Streptomycin resistance of gonococci and meningococci. J Amer Med Ass 130: 458 - 488

Murry R, Kilhan L, Wilcox C, Finland M (1946) Development of Streptomycin-resistance of gram-negative bacilli in vitro and during treatment. Proc Soc Exp Biol Med 63: 470 - 474

Murray BE, Moellering RC (1978) Patterns and mechanisms of antibiotic resistance. Med Clin N Amer 62: 899 - 923

Naumann P (1966) Bakteriologische und pharmakologische Eigenschaften der neuen Cephalosporin-Antibiotika. I. Cephalotin. Arzneimittelforschung 16: 1099 - 1104

Neubert U, Korting HCh, Ruckdeschl G (1982) Susceptability of *Neisseria gonorrhoeae* to Cefotaxime: in-vitro studies and treatment results. Arch Dermatol Res 274: 321 - 326

O'Callaghan CH, Morris A, Kirby SM, Shingler AH (1972) Novel method for detection of beta-lactamases by using a chromogenic cephalosporin substrate. Antimicrob Agents Chemother 1: 283 - 288

Otten H, Plempel M, Siegenthaler W (Hrsg.) (1975) Antibiotica Fibel, 4. Auflage, Thieme, Stuttgart, S. 23 - 28, 551 - 574

Phillips I (1976) Beta-lactamase-producing Penicillin-resistant Gonococcus. Lancet 2: 656 - 657

Phillips I, H King A, Shannon K, Warren C (1983) Cefotetan: in vitro antibacterial activity and susceptibility to beta-lactamases. J Antimicrob Chemother 11, Suppl. A: 1 - 9

Reyn A (1961) Sensitivity of **Neisseria gonorrhoeae** to antibiotics. Brit J vener Dis 37: 145 - 157

Reyn A (1969) Antibiotic sensitivity of gonococcal strains isolated in the south-east asia and western pacific regions in 1961 - 68. Bull Wld Hlth Org 40: 257 - 262

Röckl H (1959) Nimmt die Penicillin-Empfindlichkeit der Gonokokken ab? Münch Med Wochenschr 101: 708 - 712

Röckl H (1962) Welche therapeutischen Konsequenzen ergeben sich aus der abnehmenden Penicillinempfindlichkeit der Gonokokken? MMW 104: 1169 - 1174

Sarubbi FA, Blackman E, Sparling PF (1974) Genetic mapping of linked antibiotic resistance loci in **Neisseria gonorrhoeae**. J Bacteriol 120: 1284 - 1292

Simon C, Stille W (1982) Antibiotika-Therapie in Klinik und Praxis. 5. Auflage, Schattauer, Stuttgart New York, Abschnitt B

Sparling PF (1966) Genetic transformation of **Neisseria gonorrhoeae** to streptomycin resistance. J Bacteriol 92: 1364 - 1371

Sparling PF (1972) Antibiotic resistance in **Neisseria gonorrhoeae**. Med Clin N Am 56: 1133 - 1144

Sparling PF (1977) Antibiotic resistance in the gonococcus. In: Roberts RR (ed.) The Gonococcus. Wiley, New York, Chap. 6, pp. 111 - 135

Storck H, Schwarz-Speck M (1969) Zur Penicillinresistenz der Gonokokken. Dermatologica 139: 254 - 259

Taylor E, Phillips I (1979) Assessment of a selective medium for the isolation of **Neisseria gonorrhoeae**. Br J vener Dis 55: 183 - 185

Thornsberry C, Hill BC, Swenson JM, Mc Dougal LK (1983); Rifampin. Spectrum of antibacterial activity. Rev Infect Dis 5, Suppl. 3: 412 - 417

Willcox RR (1970) A survey of problems in the antibiotic treatment of gonorrhea. With special refernce to south-east asia. Br J vener Dis 46: 217 - 242

Zinsser H (1960) Microbiology. 12. edition, Appleton-Century-Crofts, New York, pp. 77 - 96

Zusammenfassung

An fünf Beta-Lactamase-freien **Neisseria gonorrhoeae**-Stämmen wurde die chromosomale Resistenzentwicklung unter subinhibitorischen Konzentrationen von Rifampicin und Cefotiam untersucht. Bei Rifampicin entwickelte sich über 25 Passagen absolute Resistenz, die mittlere minimale Hemmkonzentration stieg von 0,144 mg/l auf 4,0 mg/l. Der Verlauf entspricht dem fakultativen Ein-Schritt-Typ. Auch unter Cefotiam kam es zu einer Selektion weniger empfindlicher Keime: die mittlere minimale Hemmkonzentration nahm aber nur von 0,018 mg/l auf 0,055 mg/l zu (Mehr-Schritt-Typ der Resistenzsteigerung).

Damit ergab sich beim Cefotiam kein Unterschied zu den Hemmkonzentrationen der Vergleichsgruppe.

In der Vergleichsgruppe wurden die genannten fünf **Neisseria gonorrhoeae**-Stämme über 25 Passagen ohne Antibiotikum kultiviert. Am Ende betrug die minimale Hemmkonzentration für Cefotiam 0,055 mg/l, und für Rifampicin 0,330 mg/l. Eine klinisch relevant erscheinende Resistenzsteigerung war bei Rifampicin, nicht aber bei Cefotiam zu erkennen.

Zu Beginn, nach 25 Passagen und nach fünf weiteren Übertragungen wurde die Empfindlichkeit nicht nur gegenüber Cefotiam und Rifampicin, sondern auch gegenüber Penicillin G, Ceftizoxim, Cefotetan, Tetracyclin, Streptomycin und Spectinomycin in den drei Gruppen gemessen. Stets waren am Ende etwas höhere Antibiotikakonzentrationen zur Hemmung des Wachstums notwendig. Klinisch bedeutsame Parallelresistenzen entwickelten sich nicht.

LEBENS LAUF

N a m e	Karl-Heinz Roth
Geburtstag	24. Januar 1955
Geburtsort	München
Eltern	Alfred und Franziska Roth Kaufleute in Schrobenhausen
Familienstand	verheiratet, 2 Kinder
Zivildienst	1975 - 1977 in Ingolstadt
Ausbildungsdaten	1961 - 1965 Volksschule Schrobenhausen 1965 - 1974 Mathematisch-naturwissenschaft- liches Gymnasium Schrobenhausen 22. Juni 1974 Reifeprüfung 1974 - 1979 Studium der Volks- und Betriebs- wirtschaftslehre an der Universität Regensburg 1979 - 1985 Studium der Medizin an der Ludwig-Maximilians-Universität München 4. Dezember 1985 Ärztliche Prüfung 12. Dezember 1985 Approbation
Position zur Zeit	Assistenzarzt am Kreiskrankenhaus Schrobenhausen

